Aus dem pharmakologischen und medizinisch-chemischen
Institut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. Emil Bürgi

Vergleichende Untersuchungen über das synthetische und natürliche Vitamin C

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor pharmaciae
der medizinischen Fakultät der Universität Bern

Vorgelegt von

JOSEF HANGARTNER

Apotheker

von Altstätten (St. Gallen)

1942

Buchdruckerei H. Möschler, Bern

Aus dem pharmakologischen und medizinisch-chemischen
Institut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. Emil Bürgi

Vergleichende Untersuchungen über das synthetische und natürliche Vitamin C

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor pharmaciae
der medizinischen Fakultät der Universität Bern

Vorgelegt von

JOSEF HANGARTNER

Apotheker

von Altstätten (St. Gallen)

1942

Buchdruckerei H. Möschler, Bern

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. E. Bürgi von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 6. März 1942.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. *A. v. Muralt.*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dem Andenken meiner lieben Eltern!

Herrn Prof. Dr. E. Bürgi, Direktor des pharmakologischen und medizinisch-chemischen Institutes, danke ich für die Bemühungen und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Dozent Dr. T. Gordonoff bin ich für die Ueberlassung des Themas und die freundliche Unterstützung der vorliegenden Arbeit besonders zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. G. Beck, Assistent am medizinisch-chemischen Institut, danke ich für manche wertvolle Ratschläge.

Geschichtliches

Der Skorbut, die Vitamin C-Mangelkrankheit, wurde schon 1535 bei der Schiffsmannschaft des französischen Forschungsreisenden Cartier durch Fichtennadelaufgüsse geheilt. Der englische Arzt Cramer (1720) wurde dafür ausgezeichnet, dass er die Heilwirkungen der Citrusfrucht beim Skorbut gefunden hat. Cook, der Entdecker Australiens, soll bei seiner Mannschaft den Skorbut dadurch verhindert haben, dass er ihr täglich Aufgüsse von frisch gekeimter Gerste verabreichen liess. 1753 hat der englische Arzt Lind in seinem Buche nochmals darauf hingewiesen, dass Zitronensaft den Skorbut verhindere und empfahl, alle Schiffe mit einem Zitronenvorrat zu versehen. Diese Entdeckungen wurden aber übersehen und der Skorbut blieb stets die gefürchtetste Krankheit, durch die mehr englische Seefahrer zugrunde gingen als durch die Waffen im Kampfe für ihre Eroberungen.

1907 haben die norwegischen Forscher Holst und Frölich Meerschweinchen zur Erzeugung einer Rachitis gefüttert und stellten bald fest, dass die Tiere an einem Skorbut erkrankten. Diese Versuche haben ergeben, dass der Skorbut eine Avitaminose sei, und dass das Meerschweinchen das klassische Versuchstier für das Studium des Skorbuts und des Vitamins C ist.

Diese Beobachtungen wurden in der Folge von Holst, Höjer, Harris und anderen benützt, um experimentelle Arbeitsmethoden für das Studium des Skorbuts auszuarbeiten.

1928 hat Szent-Györgyi aus den Nebennieren, Orangen und Kohl, besonders aber aus Paprika die Hexuronsäure isoliert, die er 1932 mit dem antiskorbutisch wirksamen Vitamin C identifizieren konnte. 1933 fand Tillmans die nach ihm benannte Nachweismethode für das Vitamin C. Im gleichen Jahre war es Karrer wie auch Reichstein geglückt, die Konstitution des Vitamins C aufzuklären und bald darauf konnte Reichstein das Vitamin C als die l-Ascorbinsäure synthetisch darstellen.

Die Unrentabilität der industriellen Gewinnung des natürlichen Vitamins C in reiner Form aus Früchten, besonders aber die einfache und billige Darstellungsart des synthetischen Vitamins C führten das letztere in die Therapie zur Heilung und Prophylaxe von skorbutischen Erscheinungen ein.

Einleitung

Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit der Frage, ob das synthetische und das natürliche Vitamin C identisch seien. Allenthalben stösst man in der Literatur auf Angaben, besonders aus Kreisen, die der sogenannten Naturheilrichtung tendieren, dass das natürliche, in den Pflanzen vorkommende Vitamin C mit der synthetisch dargestellten Ascorbinsäure gar nicht identisch sei.

Diese Zweifel sind besonders aufgetreten, seit dem es Brockmann aus dem Institute von Windaus gelungen war, festzustellen, dass das aus dem Lebertran isolierte Vitamin D mit dem früher von Windaus dargestellten gar nicht identisch ist. In der Tat ist das von Windaus entdeckte Vitamin D_2 ein bestrahltes Ergosterin, während der Brockmann'sche Körper, den er aus dem Lebertran isolieren konnte, ein bestrahltes Dehydrocholesterin ist.

Trotzdem das synthetische und natürliche Vitamin C den Skorbut zu heilen vermögen, werden dennoch gerade dem in den Pflanzen vorkommenden Vitamin C bessere — von der Ascorbinsäure unterschiedliche — Wirkungen zugeschrieben. Im Auftrage des Herrn Dozenten Dr. Gordonoff habe ich mich der Aufgabe unterzogen, die beiden Vitamin-Formen biologisch zu vergleichen.

Die Unterschiede, auf welche nach Verabreichen von synthetischem und natürlichem Vitamin C immer hingewiesen wird, beziehen sich zum Teil auf die Möglichkeit, dass in der Pflanze neben dem Vitamin C noch andere, die Vitamin C-Wirkung speziell unterstützende Vitamine vorkommen könnten. v. Euler vermutete das Vorkommen eines Vitamins C_2. Er hatte nämlich an Vitamin C-arm ernährten, mit Pneumokokken infizierten Meerschweinchen beobachtet, dass Zitronen- oder Orangensaft wirksamer schütze als eine entsprechende Menge Ascorbinsäure. Schon früher hat Bezssonoff die Ansicht vertreten, dass die Vitamin C-Wirkung auf zwei Vitamin C-Fraktionen zurückzuführen sei. Szent-Györgyi und Mitarbeiter machten die Erfahrung, dass Vitamin C-reiche Paprika- und Zitronenpräparate bei der hämorrhagischen Diathese bessere Wirkung zeigten als synthetisches Vitamin C. Sie schrieben diese grössere Heilwirkung einem in den Naturprodukten vorkommenden Permeabilitätsfaktor zu, den sie später als Citrin isolierten. Moll und Küssner konnten jedoch die unterstützende Wirkung des

Citrins in Verbindung mit Ascorbinsäure am Meerschweinchenskorbut nicht eindeutig bestätigen. Ebenso erreichte F r a n k e bei der Verabreichung Vitamin C-haltiger Fruchtsäfte einen Kapillarresistenz steigernden Effekt, der mit Ascorbinsäure und Citrin zusammen ausblieb.

Daneben gibt es aber eine ganze Reihe von Erfahrungstatsachen, die ohne Bezugnahme auf ein anderes Vitamin auf einen Unterschied zwischen dem natürlichen und dem synthetischen Vitamin C selber schliessen. S j a m s o e d i n machte bei seinen Versuchen die folgende Feststellung: Bei Vitamin C-freier Ernährung starben Meerschweinchen bereits nach 5 Wochen. Wurde ihnen täglich ein halbes mgr Ascorbinsäure zur Skorbutkost verabreicht, so konnte die Lebensdauer auf 8 Wochen verlängert werden; erhielten die Tiere aber Tomatensaft entsprechend einem halben mgr Ascorbinsäure, so lebten sie bis 13 Wochen. Auch blieben diese Tiere einen Monat länger im Wachstum gegenüber jenen, die Ascorbinsäure in reiner Form erhalten hatten. Während die Ascorbinsäure-Tiere ein Gewicht von 478 gr aufwiesen, war es bei den Tomatensaft-Tieren im Durchschnitt 532 gr. E l m b y und W a r b u r g berichteten von 29 Patienten mit hämorrhagischer Diathese und einer niedrigen Ascorbinsäurekonzentration im Serum, dass drei von ihnen trotz einer täglich peroral verabreichten Dosis von 300 mgr Ascorbinsäure nicht geheilt werden konnten. Auch der Ascorbinsäurespiegel im Serum liess sich trotz diesen grossen Gaben nicht erhöhen. Darauf wurde ihnen die Ascorbinsäure intravenös zugeführt. Als sich nach einiger Zeit auch keine Besserung zeigte, erhielten die Patienten während 10 Tagen täglich den Saft von 10 Zitronen. Durch diese Behandlung verschwand die Hämorrhagie und der Serum-Ascorbinsäuregehalt stieg an. Darauf wurden die Zitronen wieder durch Ascorbinsäuregaben ersetzt, was den Vitamin C-Spiegel wieder erniedrigte, Zitronensaft erhöhte ihn wieder. S t u t z und R e i l haben Vitamin C-Spiegeluntersuchungen an Matrosen während einer Westindienfahrt zweier Segelschulschiffe durchgeführt. Sie beobachteten dabei, dass Tagesgaben von 50 mgr Ascorbinsäure bei Leuten mit und ohne Defizit nicht ausreichten, um ein Absinken des Vitamin C-Spiegels zu verhüten. Spätere Untersuchungen von S t u t z und W e i s s p f e n n i g an 50 Marinesoldaten wurden so gestaltet, dass eine Gruppe von 30 Mann täglich 50 mgr synthetisches Vitamin C erhielt, weitere 10 Mann täglich eine Zitrone erhielten, 5 Mann eine halbe und die restlichen 5 noch ¼ Zitrone. Die 50 mgr synthetisches Vitamin C genügten diesmal zur Absättigung, wenn von 4 schlechten Vitamin C-Speichern abgesehen wird. Wird der Gehalt einer Zitrone auf 50 mgr berechnet, so genügte zur Erhaltung des Vitamin C-Gleichgewichtes sowohl 25 als auch bereits 12,5 mgr natürliches C-Vitamin, also ¼ bis sogar $^1/_8$ der Ascor-

binsäuredosis. Aus dem abessinischen Feldzug liegen Berichte vor, nach denen jeder italienische Soldat über den andern Tag eine Zitrone erhielt, was ihn vor Skorbut zu schützen vermochte, während auf abessinischer Seite über 30'000 Mann wegen Skorbut ausfielen. Trotz den bequem dosierbaren und nicht mehr teuren synthetischen Vitamin C-Präparaten führt die englische Kriegsflotte nach wie vor hochwertigen Zitronensaft an Bord und Stutz und Weisspfenig empfehlen für die deutsche Flotte Hagebuttenmarmelade als Schiffsproviant. Auch Klodt berichtet von einer Ueberlegenheit des natürlichen Vitamins C im Zitronensaft gegenüber dem synthetischen. Er hatte beobachtet, dass bei einem Vitamin C-armen Organismus durch Verabreichung von Zitronen- und Orangensaft eine schnellere Auffüllung der Vitamin C-Depots erfolgt als durch eine wässrige Ascorbinsäurelösung, da letztere zugleich einer schnelleren Zersetzung unterliegt. Hamel, dessen Versuche später noch eingehender erwähnt werden, hatte bei seinen Versuchspersonen festgestellt, dass nach der Belastung mit 500 mgr reinem C-Vitamin kein vermehrter Umsatz in Form der Vitamin C-Oxydation stattgefunden hatte, sondern dass diese grossen Vitamin C-Mengen wieder im Urin ausgeschieden wurden, was er als Grossausschüttung bezeichnete. Wenn den beiden Versuchspersonen die gleich grosse C-Menge in natürlicher Form verabreicht wurde, blieben diese Grossausschüttungen aus und es trat eine bedeutende Steigerung des Verbrauches ein, die Hamel auf Oxydation zurückführte. Wilhelmi, der skorbutischen Meerschweinchen Vitamin C entweder in synthetischer Form oder als stabilisierten Hagebuttenextrakt zusammen mit der Frischkost verabreichte, sah die raschesten Heilerfolge bei jenen Tieren, die natürliches Vitamin C als Extrakt aus pflanzlichen Vitaminträgern zur Skorbutkost bekamen. Bei den Tieren, die mit reiner Ascorbinsäure geheilt wurden, verschwanden die Skorbutsymptome langsamer als bei solchen, die natürliches Vitamin C erhielten.

Ferner seien noch Arbeiten erwähnt, die erst unlängst erschienen sind, als wir unsere Versuche schon teilweise abgeschlossen hatten. Tothunter, Robbins, Ivey und Brewer haben an Meerschweinchen festgestellt, dass die Zufuhr gleicher Mengen wässriger Ascorbinsäurelösung bezw. Zitronensaft insofern einen Unterschied macht, dass Tiere, die Zitronensaft erhielten, weniger starke Blutungen hatten, während in der Gewichtszunahme der Tiere kein Unterschied festzustellen war. Scheunert und Reschke machten hingegen am Meerschweinchen die Beobachtung, dass reine Ascorbinsäure die gleiche antiskorbutische Wirksamkeit wie das natürliche in Zitronensaft, in Aepfeln und in Weisskraut vorkommende Vitamin C entfaltete. Pezold wiederum hat die Verwertung des C-Vitamins in der Hagebutte durch den menschlichen

Organismus an 240 Versuchspersonen, gesunden und kranken, untersucht und kam dabei zu folgenden Schlussfolgerungen: Die Belastungsmengen sind bei Zufuhr von natürlichem Vitamin C geringer als bei synthetischer Ascorbinsäure. Bei Belastung mit natürlichem Vitamin C bleibt die Grossausschüttung aus. Das Sättigungsdefizit kann mit unterschwelligen Dosen natürlichem Vitamin C im Gegensatz zu synthetischer Ascorbinsäure beeinflusst werden. Die Zufuhr natürlichen C-Vitamins führt neben der Auffüllung der Depots zu einer sichtlichen Erhöhung des C-Verbrauches.

Schliesslich sind noch Publikationen von A l t e r zu erwähnen. Für ihn sind überhaupt alle synthetisch dargestellten Vitamine, mögen sie auch aus einem gleichförmigen strukturellen Aufbau annähernd vergleichbare Wirkungen zu entfalten scheinen, keine echten Vitamine. Die natürlichen Vitamine haben nach seiner Ansicht einen speziellen biologischen Charakter und das Wesentliche ihrer Eigenschaften bezeichnet er als physiologische Potenzen von lebenswirksamer und lebendiger Art. Für das, was nach einer Behandlung mit Säuren, Laugen, Alkohol und hohen Hitzegraden übrig bleibt, prägt A l t e r den Ausdruck „Vitaminoide".

Problemstellung

Aus der schon zitierten Literatur ergibt sich ein Widerspruch in den Ansichten über die Identität des synthetischen mit dem natürlichen, in den Pflanzen und Früchten vorkommenden Vitamin C.

Um diese Frage zu klären, untersuchten wir

1. ob in den Ausscheidungsmengen nach Belastung mit synthetischem bezw. natürlichem Vitamin C ein Unterschied festzustellen ist,
2. ob aus dem Urin nach Belastung mit diesen Vitaminarten andere oder die gleichen Stoffe isoliert werden können und
3. ob eine Beeinflussung von Pflanzen im ersten Wachstumsstadium durch die eine oder andere Vitamin C-Art einen Unterschied ergeben würde, da einige Autoren bewiesen zu haben glauben, dass das Vitamin C für das Pflanzenwachstum unentbehrlich sei.

I. Ausscheidungsverhältnisse nach Einnahme von synthetischem und natürlichem Vitamin C

Diese Untersuchungen wurden während mehreren Wochen am Menschen und am Tier durchgeführt.

Bereits H a m e l hatte zwei Versuchspersonen mit natürlichem und synthetischem Vitamin C belastet und dabei das Ausscheidungsverhältnis beobachtet. Er verabreichte dabei sehr hohe Dosen von l-Ascorbinsäure, nämlich 500 mgr, was nachher beim Vergleich mit dem natürlichen Vitamin C umso grössere Mengen von Zitronen, Orangen, Tomaten und Bananen erforderte, um auf einen entsprechenden Vitamin C-Gehalt zu kommen.

Zitronen und Orangen enthalten durchschnittlich	0,5 gr pro kg.
Tomaten	0,05 gr,
Bananen	0,05—0,1 gr.

Es ist kaum denkbar, dass bei diesen Mengen, die notwendig waren, um eine tägliche Zufuhr von 0,5 gr Vitamin C zu ermöglichen — vor allem, wenn es sich nicht um konzentrierte Pressäfte handelte —, nicht ein teilweiser Verlust des Ausscheidungswertes durch den Stuhl vorkommt. Wir wählten daher für unsere Versuche nur eine mittlere tägliche Dosis von 150 mgr, die auch bei Einnahme des natürlichen Vitamins C in ca. 300—400 ccm reinem Orangensaft leicht eingenommen werden konnte.

Ferner scheinen sich die Erfahrungen von H a m e l auf Versuchsreihen von wenigen Tagen zu stützen, während wir unsere Untersuchungen während mehreren Wochen durchführten, indem abwechslungsweise einer Versuchsperiode mit Redoxon eine solche mit Orangensaft folgte. Auf die Umstellung auf eine besondere Vitamin C-arme Kostform verzichteten wir, da die übliche Pensionskost nur Werte zwischen 10 -15 mgr zur Ausscheidung brachte. Bei der Belastung mit 150 mgr Vitamin C war der mit der Nahrung zugeführte Anteil demnach prozentual gering.

Für die Durchführung quantitativer Bestimmungen des Vitamins C stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die meisten beruhen auf der Reduktionskraft der Ascorbinsäure gegenüber einer Oxydationslösung. Die Ascorbinsäure wird dabei zur Dehydroascorbinsäure oxydiert, während die Titerlösung reduziert wird. Soweit es sich um reine Ascorbinsäurelösungen handelt, sind solche

Bestimmungen ohne weiteres genau durchführbar. Soll aber die Vitamin C-Menge in Pflanzenextrakten oder andern biologischen Flüssigkeiten bestimmt werden, so wird einmal durch gefärbte Lösungen der Farbumschlag unsicher und zugleich können andere Stoffe, deren Redoxpotentiale in der Nähe derjenigen des Vitamins C liegen, höhere Ascorbinsäurewerte vortäuschen.

Die ersten Bestimmungen der Ascorbinsäure wurden von Tillmann in neutraler Lösung durch Titration mit dem Redoxindikator 2,6-Dichlorphenolindophenol ausgeführt, wobei dieser blaue Farbstoff zu einer Leukoverbindung umgewandelt wird. Ferner wurden Titrationen mit verdünnten Jodlösungen oder Silbernitratlösungen durchgeführt. Martini und Bonsignore empfehlen Methylenblau, das durch Ascorbinsäure bei starker Belichtung in saurem Medium fast augenblicklich zur Leukobase entfärbt wird, wobei Methylenblau und Ascorbinsäure äquimolekular reagieren. Melville und Richardson gebrauchten einen Oxazinfarbstoff, Roe eine Farbreaktion, die auf der Bildung von Furfurol beruht. Tauber und Kleiner führten ihre Bestimmungen mit der Ferricyanidtitration durch. Nach Bezssonoff reagiert das Vitamin C mit Molybdänphosphorwolframsäure unter Violettfärbung, die kolorimetrisch gemessen wird. Dass mit der Jodtitration im allgemeinen unvergleichbar höhere Werte erhalten werden als mit der Indophenolmethode, haben Harris und Ray, Frank, ferner auch Baumann und Rappolt bei vergleichenden Bestimmungen an Säuglingsurinen nachgewiesen. Die Jodwerte überstiegen oft ein mehrfaches der Indophenolwerte. Als sehr genau wird nach Hinsberg, Wachholder und Potesta, Widenbauer, Lund die Methylenblaumethode angesehen. Doch wollen Fujita und Ebihara eher zu niedere Werte beobachtet haben. Das gleiche bestätigt Tsuzuki, der mit der Methode von Martini und Bonsignore Ascorbinsäure, die dem Urin zugesetzt worden war, nur mehr zu 50 % nachweisen konnte.

Zu überragender Bedeutung ist im Laufe der Zeit die Titration mit Dichlorphenolindophenol gekommen. Wenn auch die ursprüngliche Tillmann'sche Methode durch Anwendung neutraler Lösungen ebenfalls zu hohe Werte gab, so hat es nicht an Bemühungen gefehlt, die störenden Substanzen bei der Ascorbinsäurebestimmung weitgehend auszuschalten. Durch starkes Ansäuern der Flüssigkeit suchte man Eiweisstoffe auszufällen. Harris und Ray benützen Trichloressigsäure. Emmerie und van Eekelen suchen störende reduzierende Stoffe und Farbstoffe durch Fällung mit Merkuriacetat zu entfernen und reduzieren die Dehydroascorbinsäure mit Schwefelwasserstoff, den man nachher durch einen Kohlensäurestrom vertreiben muss, da er sonst ebenfalls reduzierend wirkt. Lund bezweifelt zwar, dass die Dichlorindophenoltitration mit der Technik von Harris und Ray auf den Urin angewandt werden könne und zitiert einen Fall, wo bei einem Patienten mit manifestem Skorbut eine grössere 24-Stunden-Ausscheidung zu verzeichnen war, als bei 4 Ischiaskranken, trotzdem der Skorbutpatient auf eine C-vitaminfreie Kost gesetzt war, während die Ischiaspatienten Vollkost bekamen. Da Lund dann nach der für ihn spezifischen Methylenblaumethode sehr niedrige Werte erhält, kommt er zum Schluss, dass Ascorbinsäure kein normaler, in jedem Fall kein gewöhnlicher Bestandteil des Urins sei, oder dass die Möglichkeit bestehe, dass das Vitamin C bereits in den Harnwegen oxydiert werde.

Eine Methode, die zuverlässige Werte ergibt, ist die von Tauber und Kleiner in der Modifikation von Neuweiler mit der Ascorbinsäureoxydase. Sie beruht darauf, dass eine in verschiedenen Pflanzen vorkommende Oxydase, die für Ascorbinsäure als spezifisch gilt, zur Ermittlung des wahren Vitamin C-Wertes herangezogen wird. Es wird zuerst der Gesamtreduktionswert

der zu bestimmenden Flüssigkeit titriert, dann wird die Oxydase zugesetzt, die die Ascorbinsäure oxydiert und nach einiger Zeit nochmals die sogenannte Restreduktion bestimmt. Aus der Differenz der beiden Titrationswerte ergibt sich dann der wahre Vitamin C-Gehalt. Wie wir selber beobachten konnten, lassen sich auf diese Weise sehr genaue Gehaltsbestimmungen durchführen, besonders noch, wenn es sich um die Feststellung kleiner Ausscheidungswerte handelt. Jedoch ist sie etwas zeitraubend und die Genauigkeit ist weitgehend davon abhängig, aus was man die Oxydase gewinnt. Extrakte aus Gurken, Kürbis, gelben Rüben eignen sich gut, weil sich die Extraktionsflüssigkeiten nicht sehr stark verfärben. Nach H a m e l soll sich ein Extrakt aus Blumenkohl gerade wegen der farblosen Flüssigkeit sehr gut bewährt haben. Aepfelextrakte dagegen verfärben sich rasch und erschweren auch bei starker Verdünnung den Umschlagspunkt; ebenso auch Kartoffelextrakte. Es ist unbedingt notwendig, die Wirksamkeit der Oxydase erst durch einen blinden Versuch mit Ascorbinsäure zu prüfen, da es unter gewissen Verhältnissen vorkommen kann, dass der Reduktionswert nach der Bebrütung mit der Oxydase höher ist als bei der ersten Titration. Das war einmal bei uns der Fall mit einem aus Kartoffeln gewonnenen Oxydaseextrakt, was sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass gekeimte Kartoffeln verwendet wurden.

Eine der Oxydasemethode analoge Bestimmung beschreibt O t t. Sie eignet sich besonders für die Fälle, bei denen die Vitamin C-Lösungen noch Eisen enthalten. Dreiwertiges Eisen setzt sich mit der Ascorbinsäure unter Bildung von zweiwertigem Eisen und Dehydroascorbinsäure um. Durch Bestimmung der gesamten Ascorbinsäure durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff stört das gebildete zweiwertige Eisen die Titration mit Dichlorphenolindophenol und täuscht zu hohe Resultate vor. Nach Versuchen O t t's lässt sich eine spezifische Bestimmung dadurch vornehmen, dass die Auszüge nach Reduktion sofort titriert werden und in einem aliquoten Teil eine nochmalige Titration nach Zugabe geringer Mengen von Kupfersalz vorgenommen wird, die das Vitamin C in kurzer Zeit zerstören. Aus der Differenz der beiden Titrationen ergibt sich der Gehalt an Vitamin C. Statt Schwefelwasserstoff wird ein Cadmiumreduktor oder Zink verwendet.

N a g a y a m a, T o m o i u. S a g a r a beschreiben eine weitere Methode, die nach Beseitigung der Restreduktion mittelst Phosphorwolframsäure den wahren Vitamin C-Gehalt des Harnes zu bestimmen erlaubt. Beim Ausarbeiten dieser quantitativen C-Bestimmung konnten die Autoren feststellen, dass die Restreduktion im Harn nicht so sehr dem Glutathion, dem Cystein oder dem Thiosulfat zuzuschreiben ist, wie man früher annahm, sondern vor allem den Harnfarbstoffen. Die Harnfarbstoffe sowie die anderen reduzierenden Körper werden durch die Phosphorwolframsäure gefällt, während Glutathion, Cystein und Thiosulfat, die übrigens in geringen Mengen im normalen Harn stets vorhanden sind, nicht entfernt werden. Um ihren eventuellen Einfluss auf Thiosulfat genügend auszuschalten, wird der Harn zuerst mit Metaphosphorsäure angesäuert. Eine reine, mit Metaphosphorsäure angesäuerte Ascorbinsäurelösung lässt sich durch kurzes Einwirken mit Phosphorwolframsäure nicht oxydieren. Dem Harn zugesetzt, wirkt Phosphorwolframsäure fast gar nicht auf Ascorbinsäure ein, weil sie dabei grösstenteils mit andern Substanzen reagiert. Verfasser machten auch vergleichende Bestimmungen zwischen der Ferment- und der Phosphorwolframsäuremethode und das Ergebnis war gut übereinstimmend.

Da sich nach verschiedenen Kontrollversuchen diese Methode auch für unsere Arbeit als rasch und hinreichend genau erwies, führten wir unsere Bestimmungen auf folgende Art durch:

20 ccm Urin werden mit 2,0 ccm 20 %iger Metaphosphorsäure versetzt, dann fügt man 3,0 ccm 10 %iger Phosphorwolframsäure zu (10 gr Phosphorwolframsäure + 25 ccm Schwefelsäure [d = 1,105] mit Wasser zu 100 ccm ergänzt),

mischt genügend und zentrifugiert 5 Minuten. Die überstehende klare Flüssigkeit wird dann gegen 4 ccm 20 mg %ige Dichlorphenolindophenollösung titriert. Bei sehr geringen Ascorbinsäurewerten verwendet man besser eine 2 mg %ige Farbstofflösung. Da hiebei die Verdünnung des Harnes 1,25 ist, wird der Vitamin C-Wert nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Faktor der Indophenollösung} \times 4 \times 1{,}25}{\text{Verbrauchte Menge der untersuchten Flüssigkeit}} \times 1000 \text{ bzw. } 100 = \text{mg\% Vitamin C}$$

Die Dichlorphenolindophenollösung stellten wir her, indem wir 0,1 gr des Farbstoffes unter Zusatz einer Messerspitze $NaHCO_3$ mit Wasser zu 500 ccm lösten. Die Einstellung erfolgte mit einer 0,01 n-Ascorbinsäurelösung = 88 mgr Ascorbinsäure mit kohlensäurehaltigem Wasser zu 100 ccm gelöst. Obwohl Ascorbinsäure trocken aufbewahrt ziemlich stabil bleibt, kontrolliert man sie doch vorsichtshalber mit einer 0,005 n-Jodlösung. Den Faktor der Dichlorphenolindophenollösung bestimmten wir mit 1 ccm der 0,01 n-Ascorbinsäurelösung unter Zusatz von 2 ccm Metaphosphorsäure. Die Farbstofflösung soll nicht länger als 3 Wochen aufbewahrt werden, und zwar im Eisschrank. Jede Woche ist sie zu kontrollieren.

Wegen der Oxydationsgefahr des Vitamins C ist es wichtig, den Urin sofort nach der Ausscheidung zu titrieren, oder, da dies in vielen Fällen nicht möglich ist, sucht man durch Zusatz von Stabilisatoren und Verhinderung des Luftzutritts die Oxydation wenigstens zu verzögern. Hahn hat als Konservierungsmethode für die Ascorbinsäure im Urin vorgeschlagen, den Urin mit Paraffin zu überschichten. Widenbauer, Schröder, Hess und Benjamin säuren ihn an, was beides aber nur auf kurze Zeit eine Oxydation verhindern kann. Anders und Uhlenbrook haben einen Zusatz von Glutathion ausprobiert und konnten beobachten, dass dieser Körper einen guten Schutz für Ascorbinsäure bedeutet. De Caro vermutet sogar, dass Glutathion jene Substanz sei, welche die Oxydation der Ascorbinsäure in den Geweben verhindert. Mawson und Gabbe sind der Ansicht, dass keineswegs Glutathion allein einen genügenden Oxydationsschutz zu bieten vermag, dass vielmehr noch andere Stoffe daran beteiligt sein können. Nach Erfahrungen von Wachholder und Hamel wirkt Glutathion erst nach starkem Ansäuern hinreichend oxydationsverhindernd. Holmes und Campbell haben zur Verhinderung von C-Verlusten beim Sammeln des 24-Stunden Harnes vorgeschlagen, in das Gefäss mit der jeweiligen Harnprobe 50 ccm Eisessig, 3 gr $CaCO_3$-Pulver und ein 2-Grammstück Marmor zu geben und dann nach einer halben Minute mit einer Gummiklappe zu verschliessen. Durch die Verdrängung der Luft werden Verluste vermieden. Rosenthaler empfiehlt, zum stark angesäuerten Urin noch einen Kristall Thymol zuzugeben, um eventuelle Ascorbinsäure oxydierende Mikroorganismen in ihrer Tätigkeit zu behindern. In unsern Versuchen benützten wir zur Aufbewahrung des Nachturins eine Flasche mit einer Gummiklappe, in die wir ein Gemisch von Eisessig und Metaphosphorsäure gaben mit einem Thymolkristall und aus der wir durch einen starken CO_2-Strom vorher die Luft verdrängten.

Wie bereits erwähnt, wurde eine tägliche Dosis von 150 mgr Vitamin C (3-mal täglich 1 Tablette Redoxon*) bzw. 300—400 ccm Orangensaft) eingenommen. Da wir unsere Versuche im Sommer durchführten, standen uns nur Orangen zur Verfügung, die seit

*) Der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. in Basel, die so freundlich war, für unsere Versuche grössere Mengen Redoxon, Dichlorphenolindophenol und Hesperidin zur Verfügung zu stellen, möchten wir an dieser Stelle unseren besten Dank abstatten.

einiger Zeit gelagert waren und einen verhältnismässig niedrigen Vitamin C-Gehalt aufwiesen. Immerhin war auch an das Vorkommen gebundener Ascorbinsäure zu denken. Nach G u h a findet sie sich in der Pflanze sogar bis zu 70 % des Gesamtgehaltes in gebundener Form vor. M c H e n r y und G r a h a m, sowie R e e d m a n n und M c H e n r y kamen zum Ergebnis, dass bei einer Anzahl verschiedener Gemüse wie z. B. Mohrrüben und Kartoffeln, nach vorhergehendem Erhitzen oder nach Behandlung mit Salzsäure die Titrationswerte im Filtrat des enteiweissten Gewebes höher sind, als im eiweissfreien Filtrat des nicht vorbehandelten Gewebes. Bei andern Pflanzen, besonders bei Früchten, war eher eine Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes nach vorhergehendem Erhitzen festzustellen. Nach H o l t z und R e i c h e l sollen die üblich angewandten Enteiweissungsmittel nicht genügen, um gebundene Ascorbinsäure freizumachen. Sie halten eine Hydrolyse mit Salzsäure bei 100° für unbedingt notwendig, um bei der darauffolgenden Titration den Gesamtascorbinsäuregehalt erfassen zu können. Wenn auch nicht anzunehmen war, dass der niedrige Vitamin C-Gehalt unserer Orangen auf das Vorhandensein eines beträchtlichen Teiles von gebundener Ascorbinsäure zurückzuführen sei, so haben wir dennoch in verschiedenen Versuchen Proben unseres Pressaftes samt Gewebeteilen einer Hydrolyse mit Salzsäure unterworfen, wobei wir noch während dem Erhitzen Kohlensäure zuleiteten.

Wir konnten nach dieser Vorbehandlung keinen Zuwachs, vielmehr einen geringen Verlust von Ascorbinsäure feststellen. Immerhin führen wir das Ergebnis von R e i c h e l t und H o l t z an, die in Gemüsen und Aepfeln gebundene Ascorbinsäure nachweisen konnten, weil sich vielleicht einige der beobachteten Unterschiede in der Literatur bei Anwendung von synthetischem und natürlichem Vitamin C auf das Vorhandensein der gebundenen Form bei den natürlichen C-Spendern zurückführen lassen, die durch die angewandte Titration nicht erfasst wurde.

Der Orangensaft wurde täglich frisch gepresst, nach der für den Urin angewandten, oben beschriebenen Bestimmungsmethode der Vitamin C-Gehalt ermittelt und eine 150 mgr Vitamin C entsprechende Menge eingenommen. Da der Urin bei längerer Aufbewahrung als 24 Stunden eine Abnahme des Reduktionswertes zeigte, liessen wir den Samstagurin unberücksichtigt. Die Belastungen jedoch wurden täglich gleichmässig durchgeführt.

Die nachstehende Aufstellung gibt die Ausscheidungswerte wieder, die nach Einnahme von synthetischem bzw. natürlichem Vitamin C festgestellt wurden.

Ausscheidungsverhältnisse nach Einnahme von täglich 150 mgr synthetischem bzw. natürlichem Vitamin C.

Tag	Tabl. Redoxon bzw. entsprechende Menge Orangensaft	mg % Vit. C in Orangensaft	Urinmenge in ccm	mg % Vit. C im Urin	Ausgeschiedenes Vit. C in mg Gesamtausscheidung
Juni 3.	3 Tabl. zu 50 mg	—	1100	2,45	26,51
„ 4.	„	—	860	2,58	22,18
„ 5.	„	—	980	2,53	24,79
„ 6.	„	—	1030	3,42	35,22
„ 7.	„	—	890	10,4	92,56
„ 8.	„	—	910	9,84	89,5
„ 9.	„	—	—	—	—
„ 10.	„	—	720	11,4	80,64
„ 11.	„	—	765	13,4	102,5
„ 12.	„	—	900	15,32	137,88
„ 13.	„	—	1100	12,61	138,82
„ 14.	„	—	1234	9,16	113,1
„ 15.	„	—	—	—	—
„ 16.	„	—	850	12,3	104,55
„ 17.	„	—	1260	9,44	118,0
„ 18.	337 ccm O'saft	44,2	980	11,18	109,56
„ 19.	357 „	42,0	1236	9,28	102,4
„ 20.	363 „	41,3	1046	12,64	132,2
„ 21.	343 „	43,8	1080	13,23	142,88
„ 22.	390 „	38,46	—	—	—
„ 23.	375 „	40,0	—	—	—
„ 24.	332 „	45,4	952	12,6	119,95
„ 25.	322 „	46,2	1200	10,17	122,05
„ 26.	306 „	49,0	1212	10,02	121,44
„ 27.	424 „	35,4	1196	13,44	160,74
„ 28.	345 „	42,25	1202	12,19	146,53
„ 29.	292 „	51,3	—	—	—
„ 30.	300 „	50,0	1300	9,4	122,3
Juli 1.	378 „	39,6	986	13,4	120,1
„ 2.	3 Tabl. Redoxon	—	1092	13,03	142,38
„ 3.	„	—	906	15,9	144,2
„ 4.	„	—	1068	17,35	185,39
„ 5.	„	—	1200	12,12	145,54
„ 6.	„	—	—	—	—
„ 7.	„	—	1270	16,8	213,58
„ 8.	„	—	1150	10,1	116,15

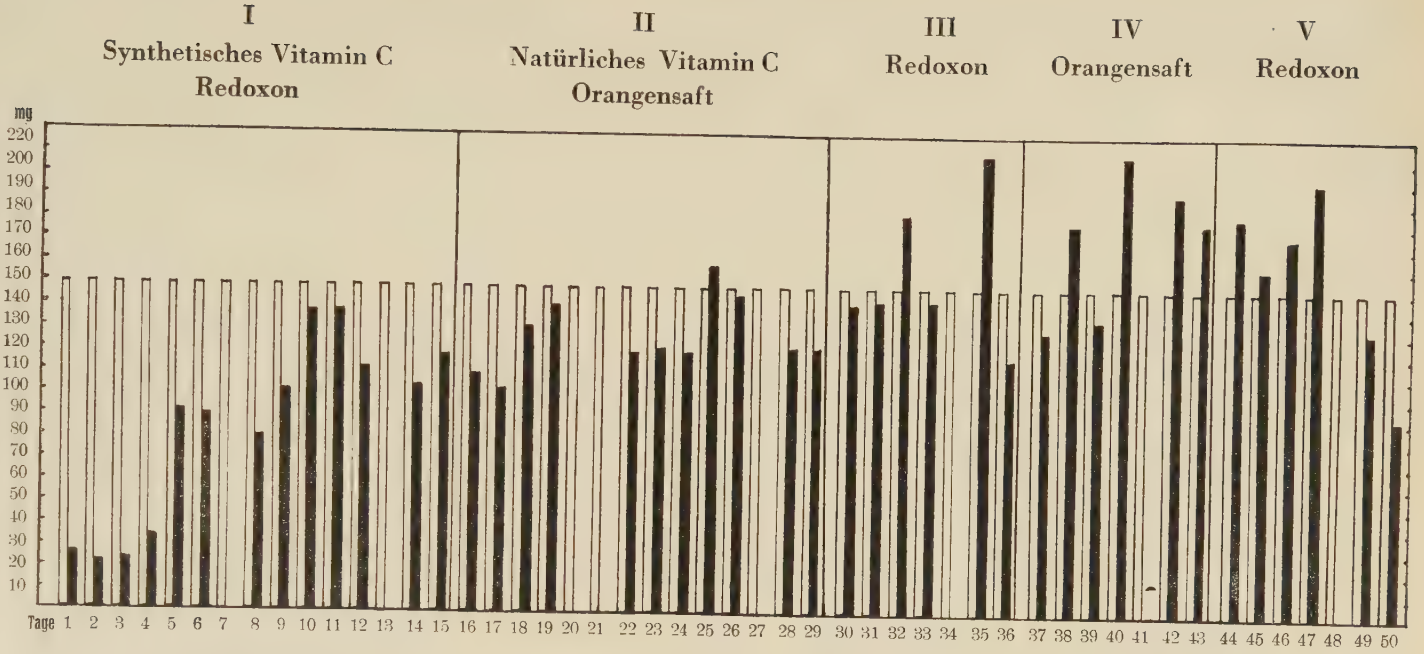
Tag	Tabl. Redoxon bzw. entsprechende Menge Orangensaft	mg % Vit. C in Orangensaft	Urinmenge in ccm	mg % Vit. C im Urin	Ausgeschiedenes Vit. C in mg Gesamtausscheidung
Juli 9.	377 ccm O'saft	39,8	1304	10,0	130,4
„ 10.	439 „	34,13	1134	15,82	179,39
„ 11.	432 „	34,71	1362	10,07	136,95
„ 12.	419 „	35,8	1152	19,2	212,3
„ 13.	408 „	36,74	—	—	—
„ 14.	416 „	36,0	1044	18,74	195,69
„ 15.	405 „	36,96	968	18,64	180,51
„ 16.	3 Tabl. Redoxon	—	910	20,13	173,92
„ 17.	„	—	1102	14,59	160,78
„ 18.	„	—	1062	16,46	174,8
„ 19.	„	—	944	20,3	201,0
„ 20.	„	—	—	—	—
„ 21.	„	—	1004	13,13	131,8
„ 22.	„	—	896	10,37	92,9

Die in der graphischen Darstellung aufgezeichneten weissen Kolumnen stellen die Belastung dar, die schwarzen die Ausscheidung. In den ersten vier Tagen ist fast kein Anstieg der Ausscheidung zu verzeichnen. Von den täglich eingenommenen 150 mgr Redoxon sind im Urin nicht mehr als 25 % nachweisbar. Auch reversible Ascorbinsäure war nur in ganz unbedeutenden Mengen feststellbar. Es ist also noch ein bedeutendes Sättigungsdefizit vorhanden. B a u m a n n ist der Ansicht, dass erst durch zusätzliche perorale Belastung von 50 bis 100 mgr bis zu einer C-Ausscheidung im Harn von 60—80 % der täglichen Zufuhr der Sättigungsgrad des Organismus sich genauer bestimmen lasse, während Y o u m a n n eine Sättigung bereits dann als erreicht sieht, wenn nach einmaliger peroraler Dosis von 600 mgr 30 %, d. h. 180 mgr wieder ausgeschieden werden. Wie wir in späteren Versuchen feststellen konnten, trifft dies nicht zu, da bei einer so hohen Dosis von 600 mgr der Organismus infolge seines beschränkten Aufnahme- und Oxydationsvermögens mehr als 30 % ausscheiden kann, ohne dass damit eine Sättigung erreicht ist.

Mit dem 5. Belastungstage stieg die Ausscheidungsmenge mehr als um das Doppelte an. Der Höhepunkt dieser 1. Reihe wird bei 138 mgr erreicht, die mittlere Ausscheidung beträgt 101 mgr, ohne dass die ersten vier Tage einbezogen werden, die zum Auffüllen der Depots nötig waren.

Nach den 15 Belastungstagen mit synthetischem Vitamin C wurde während weiteren 2 Wochen täglich eine 150 mgr entsprechende

Tabelle 1.



Weisse Kolumnen: eingenommenes Vitamin C als Redoxon bzw. Orangensaft.

Schwarze Kolumnen: ausgeschiedenes Vitamin C.

Menge Orangensaft eingenommen. Die Ausscheidungswerte liegen alle über 100 mgr und haben ihr Mittel bei 127 mgr. Der Höhepunkt wird bei 160 mgr erreicht, was bei einer vollständigen Absättigung des Organismus und den 10—15 mgr, die von der täglichen Nahrung her noch zur Ausscheidung übrig bleiben, leicht verständlich wäre, wenn nicht nachher wieder ein Absinken unter die Zufuhrmenge stattfände. In der dritten Ausscheidungsperiode, während welcher wieder Redoxon zugeführt wurde, werden noch höhere Werte erreicht, die sogar ziemlich über jene Werte aus der Nahrung und dem zusätzlich zugeführten Vitamin C hinausgehen. Es ist daraus zu schliessen, dass der Organismus Vitamin C nur bis zu einem gewissen Punkte aufspeichern kann, und dass dann durch eine weitere Zufuhr eine Auschüttung angeregt wird, wobei auch aufgespeichertes Vitamin C aus den Depots mitgerissen wird, was meist ein nachfolgendes Absinken der Ausscheidung bedingt. Diese Grossausscheidungen kommen bei länger andauernden höheren Belastungen vor, und zwar sowohl bei Zufuhr von synthetischem als auch natürlichem Vitamin C. Besonders in den Versuchsreihen IV und V sind sie besonders stark. Der Organismus findet demnach für das natürliche Vitamin C keine bessere Verwertung als für das synthetische. Durchschnittlich wird in den Versuchsreihen III und V bei Zufuhr von Redoxon gleichviel ausgeschieden. In der Reihe IV mit Orangensaft liegt der Durchschnittswert pro Tag um 15 mgr höher. Ein Zusammenhang zwischen der Grösse der Vitamin C-Ausscheidung zur Urinmenge scheint in unseren Versuchen nicht direkt vorzuliegen.

Versuchsabschnitt:	III (Redoxon)	IV (Orangensaft)	V (Redoxon)
Gesamturin:	6686 ccm	6964 ccm	5918 ccm
Ausgeschiedene Gesamtmenge Vitamin C	947,24 mg	1035,44 mg	945 mg

Dagegen ist der durchschnittliche Vitamin C-Gehalt im Urin in den drei letzten Versuchsabschnitten in ganz leichtem Steigen, d. h. das Speicherungsvermögen, bzw. das Oxydationsvermögen des Organismus nimmt etwas ab.

In der III. (Redoxon) Versuchsserie wurden täglich durchschnittlich 14,2 mgr %, in der IV. (Orangensaft) 15,4 mgr % und in der V. (Redoxon) 15,8 mgr % Vitamin C ausgeschieden.

Nach der gleichen Bestimmungsmethode wurden nun auch die Ausscheidungsverhältnisse beim Kaninchen beobachtet. Wenn sich der Versuch bloss auf zwei Tiere beschränkt, so kann er immerhin als eine Bestätigung des ersten Versuches angesehen werden.

Das meist verwendete Tier bei Vitamin C-Untersuchungen ist das Meerschweinchen. Indessen wollten wir ja nicht die therapeutische Wirkung des synthetischen bzw. des natürlichen Vitamins C unter-

suchen, sondern nur die Ausscheidungsverhältnisse. Die Tiere erhielten während der Versuchsdauer kein Grünfutter, sondern nur Körner und Wasser. Eine gewisse Schwierigkeit bestand im Auffangen und Aufbewahren des Harnes, da wir die Verwendung des Katheters umgehen wollten. Wir fanden einen Ausweg, indem wir die Tiere in Stoffwechselkäfigen hielten, deren Bodengitter mit einem neutralen Lack und die Ablaufvorrichtungen noch mit Paraffin überzogen waren. An das Ablaufrohr schlossen wir eine Flasche dicht an. In diese wurde, wie es Holmes und Campbell empfehlen, Eisessig, Kalziumkarbonat und Marmor gegeben. Den Harn bestimmten wir immer möglichst frisch. Da wir die Vitamin C-haltigen Lösungen immer um die gleiche Zeit zuführten und die Tiere daneben wenig Wasser zu sich nahmen, wurde wenig Urin über Nacht ausgeschieden, und meist mussten wir die Tiere durch Ausdrücken der Blase zum Harnausscheiden veranlassen. Beide Kaninchen erhielten zuerst während einigen Tagen 50 mgr Redoxon, da die Ausscheidungswerte anfänglich sehr niedrig waren. Nachdem der Urin von Tier A einen Reduktionswert von 1,1 mgr, der von Tier B 1,6 mgr anzeigte, begann der eigentliche Versuch.

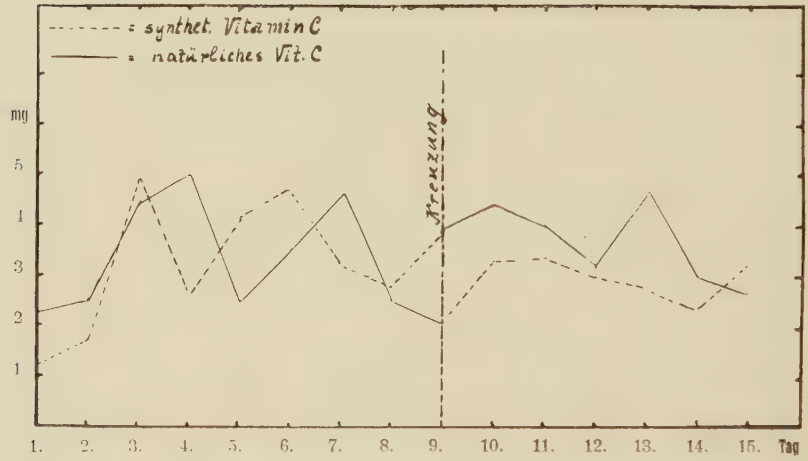
Ausscheidung bei Kaninchen nach peroraler Zufuhr von täglich 50 mgr synthetischem bzw. natürlichem Vitamin C.

Tag	Vitamin C 50 mg als Redoxon oder Orangensaft		Urin in ccm		mg % Vit. C im Urin		Ausgeschiedenes Vit. C in mg	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1.	Redoxon	Orangensaft	45	50	2,8	4,5	1,26	2,25
2.	„	„	50	45	3,33	5,5	1,66	2,5
3.	„	„	60	95	8,22	4,75	4,92	4,41
4.	„	„	70	60	3,7	8,3	2,59	4,98
5.	„	„	55	25	7,5	9,8	4,12	2,45
6.	„	„	61	31	7,56	11,2	4,61	3,47
7.	„	„	37	32	8,76	14,47	3,23	4,63
8.	„	„	42	37	6,6	6,93	2,77	2,56
9.	„	„	70	25	5,55	8,54	3,88	2,1
10.	Orangensaft	Redoxon	30	32	14,7	10,41	4,41	3,33
11.	„	„	90	45	4,45	7,44	4,01	3,34
12.	„	„	75	62	4,37	4,86	3,28	3,01
13.	„	„	125	45	3,75	6,31	4,68	2,83
14.	„	„	90	45	3,36	5,35	3,03	2,41
15.	„	„	93	60	2,90	5,59	2,70	3,35

Tier A erhielt weiter 50 mgr Redoxon täglich in ca. 60—80 ccm Wasser. Tier B erhielt nur Orangensaft, der in 60—80 ccm 50 mgr Vitamin C enthielt.

Um nicht allzu grosse Flüssigkeitsmengen verabreichen zu müssen, konzentrierten wir den Orangensaft unter vermindertem Druck auf die Hälfte und bestimmten jeweils seinen Gehalt, der im Laufe von einer Woche etwas abnahm. Er wurde unter Kohlensäure und im Kühlschrank aufbewahrt und mit der Magensonde körperwarm eingegeben. Die Redoxon-Dosis wurde in einer entsprechenden Menge Wasser aufgelöst. Nach 9 Tagen wechselten wir mit der Darreichungsform ab. Tier A erhielt nun Orangensaft, Tier B Redoxon.

Tabelle 2. *Ausscheidungsverhältnisse bei Kaninchen.*



Da die Tiere eine Vitamin C-arme Nahrung erhielten, wurde der grösste Teil des zusätzlich erhaltenen Vitamins im Organismus verbraucht und nur ein geringer Prozentsatz ausgeschieden. Grossausscheidungen, wie wir sie bei den ersten Versuchen am Menschen beobachten konnten, waren hier aus dem angeführten Grunde nicht zu erwarten. Der Tagesdurchschnitt der Vitamin C-Ausscheidung in den ersten 9 Tagen beträgt bei Tier A mit Redoxon 3,22 mgr, bei Tier B mit Orangensaft 3,26 mgr. In den nächsten 6 Tagen, während welchen mit der Darreichung der beiden Vitamin C-Formen abgewechselt wurde, beträgt die durchschnittliche Tagesmenge bei Tier A mit Orangensaft 3,68, bei Tier B 3,04 mgr.

Die Ausscheidung zeigt bei beiden Tieren nahezu gleiche Schwankungen, die während den ersten 10 Tagen zwei um einen Tag verschobene Parallelkurven ergeben. In den letzten vier Tagen sind die Ausscheidungswerte bei Tier B nach Redoxonzufuhr nicht

mehr so schwankend. *Ein Unterschied in den Ausscheidungsmengen bei Darreichung von synthetischem oder natürlichem Vitamin C an Kaninchen konnte nicht festgestellt werden.*

Zusammenfassung.

In Versuchen an Mensch und Tier wurde gesucht, festzustellen, ob nach Belastung mit synthetischem Vitamin C (Redoxon) bzw. natürlichem Vitamin C (Orangensaft) ein Unterschied in der Ausscheidung zu sehen wäre. In beiden Fällen sah man die schon von Hamel wie auch von Jezler und Kapp beobachteten mehr oder weniger rhythmischen Schwankungen in der Ausscheidung, die aber beinahe gleich in unseren beiden Fällen waren. *Einen Unterschied in der Ausscheidung nach Einnahme der einen oder andern Vitamin C-Form konnten wir nicht feststellen.*

II. Isolierungsversuche von Vitamin C aus dem Urin nach Belastung mit synthetischem und natürlichem Vitamin C

Wenn nach Belastung des Organismus mit Vitamin C mit den bekannten titrimetrischen Bestimmungsmethoden Ausscheidungswerte erhalten werden, die das Auftreten des vom Organismus nicht zurückbehaltenen Vitamins C im Urin kaum mehr bestreiten lassen, so sind diese Messungen doch immerhin nur ein indirekter Beweis, der sich auf die wenig spezifische Eigenschaft des Reduktionsvermögens der Ascorbinsäure gründet. Besonders bei normalem Urin waren die Zweifel für das Vorkommen des Vitamins gross, da es ebensogut möglich war, dass die kleinen Werte, die man erhielt, von andern reduzierenden Stoffen im Urin herrührten, besonders wenn der Urin nicht genügend vorgereinigt war.

Lund hatte das Vorkommen von Vitamin C im normalen Urin überhaupt in Frage gestellt und die erhaltenen Ascorbinsäurewerte auf andere reduzierende Substanzen zurückgeführt, die durch eine ungeeignete Bestimmungsmethode bei der Titration miterfasst worden waren. Auch Wieters kam zu ähnlichen Vermutungen. Er hatte von verschiedenen Personen Proben normalen Urins gesammelt und durch Eindampfen und Reinigen ein Konzentrat hergestellt, das er in Dosen von 0,6—1,8 mgr Vitamin C an Vitamin C-frei ernährte Meerschweinchen verabreichte. Bei keinem der Tiere

konnte eine Heilwirkung beobachtet werden, alle gingen an Skorbut ein. Setzte er dagegen dem Urin Ascorbinsäure zu, konzentrierte und reinigte nach dem gleichen Verfahren, so konnte er mit Dosen von 0,67—1,34 mgr eine Heilwirkung bei skorbutkranken Meerschweinchen erzielen. Nach diesen Erfahrungen stellte es Wieters ernsthaft in Zweifel, ob im normalen menschlichen Urin Ascorbinsäure überhaupt ausgeschieden werde.

Anders verhielt es sich mit Urinen nach vorhergehender starker Belastung mit Ascorbinsäure. Demole fand, dass bei Hunden nach Zufuhr sehr grosser Mengen Ascorbinsäure etwa 75 % im Harn ausgeschieden werden, und dass der Urin solcher Tiere Meerschweinchen vor Skorbut schützte. Wieters hat daraufhin verschiedenen Versuchspersonen grosse Dosen Ascorbinsäure (1 gr täglich) verabreicht und die am stärksten reduzierenden Urinproben gesammelt und aufgearbeitet. Bei diesen Versuchen gelang es ihm, aus dem Urin kristallisierte Ascorbinsäure zu gewinnen und sie chemisch zu identifizieren. Hinsberg und Ammon versuchten, aus normalem Urin ein Vitamin C Osazon darzustellen, was ihnen nicht gelang, und sie schlossen daraus, dass der normale Urin weniger als 0,3 mgr % Ascorbinsäure enthalte. Setzten sie dagegen Ascorbinsäure dem Urin zu, so erhielten sie Verbindungen, die sie als das Osazon der Dehydroascorbinsäure identifizierten. Bei Belastung eines Hundes mit Ascorbinsäure gelang es ihnen ebenfalls, aus dem Urin ein Osazon darzustellen, das weitgehend mit dem andern übereinstimmt. Meyer, der Ascorbinsäure aus Tonsillen kristallin isolieren konnte, was früher schon Szent-Györgyi aus Nebennieren gelungen war, stellte es zwar wegen kleinen Unterschieden im Schmelzpunkt und Drehungsvermögen in Zweifel, ob es sich bei dem aus dem Hundeurin isolierten Körper um das wirkliche Vitamin C-Osazon handle. Indessen haben auch Drumm, Scarborough und Stewart ein Dinitrophenylhydrazinderivat aus normalem Urin gewonnen, das sie als Hydrazon der Ascorbinsäure bezeichnen.

Es fehlt auch sonst nicht in der Literatur an Angaben über die Darstellung des Vitamins C aus dem Harne. Wildbolz berichtet z. B., es sei Pijoan gelungen, aus dem Urin vitaminreich ernährter Personen das Vitamin C zu kristallisieren. Wir fanden aber nirgends genauere Angaben über diese Versuche und konnten uns auch des Krieges wegen mit dem Verfasser nicht in Verbindung setzen. Roe und Hall stellten Dinitrophenylhydrazinderivate der Ascorbinsäure her, die sie durch Kochen mit $SnCl_2$-haltiger Salzsäure zerlegten und das gebildete Furfurol kolorimetrisch bestimmten. Mit dieser Methode liess sich noch die Menge von 0,02 mgr Vitamin C in 4 ccm nachweisen. Sie fanden mit derselben Methode bei normal ernähr-

ten Personen von 0 bis 297 % niedrigere Werte im Harne als mit der Tillmanns-Reaktion.

Zuerst arbeiteten wir nach dem von Wieters angewandten Reinigungsverfahren. Während zwei Tagen wurden ungefähr 5 gr l-Ascorbinsäure eingenommen und der Gehalt im Urin nachher mit der früher beschriebenen Titrationsmethode bestimmt. 2500 ccm Urin ergaben einen Reduktionswert, der auf das Vorhandensein von 2150 mgr Ascorbinsäure schliessen liess, was auch der eingenommenen Menge entsprechen konnte. Dann wurde der Urin erst schwach mit Salzsäure angesäuert (pH ca. 5) und reichlich Schwefelwasserstoff durchgeleitet. Darauf konzentrierten wir den Urin unter vermindertem Druck bei einer 40 Grad nicht übersteigenden Temperatur. Um starkes Schäumen zu verhüten, setzten wir ein paar Tropfen Oktylalkohol zu. Der Urin wurde soweit eingeengt, bis eine dunkelbraune sirupöse Flüssigkeit entstand, aus der bereits Salze auszufallen begannen. Nach kräftigem Ansäuern dieses Konzentrates mit Salzsäure wurden anorganische Salze durch Eintropfen des drei- bis vierfachen Volumens Methanol unter Rühren ausgefällt. Im Filtrat wurde der Reduktionswert bestimmt, der bereits einen beträchtlichen Verlust an Ascorbinsäure ergab, jedenfalls durch Oxydation. Vom salzigen Rückstand lösten wir einen Teil wieder in Wasser und prüften titrimetrisch auf anwesende Ascorbinsäure. Die Bestimmung ergab, dass keine Ascorbinsäure im Rückstand enthalten war. Nach Abdestillieren des Methanols, ebenfalls im Vacuum bei niedriger Temperatur, geschah die weitere Reinigung durch eine Bleifällung. Zu dem braunroten Ascorbinsäurekonzentrat wurde eine konzentrierte Lösung von Bleiacetat gegeben. (Auf 2,5 Liter Urin wurden 75 gr Bleiacetat in Wasser gelöst.) Dadurch fiel ein grosser Teil von Ballaststoffen aus. Ist die Lösung sauer genug, so wird Ascorbinsäure nicht mitgefällt. Das Filtrat ergab noch einen Gehalt von 1155 mgr. Das Filtrat kühlten wir auf 0 Grad ab und leiteten gleichzeitig einen Kohlensäurestrom durch. Unter Umrühren wurde nun Ammoniak zugegeben bis zur alkalischen Reaktion und dadurch die Ascorbinsäure als Bleiascorbinat ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde rasch isoliert, mit luftfreiem Wasser gewaschen und in Wasser suspendiert, dann reichlich Schwefelwasserstoff eingeleitet und das Bleiascorbinat wieder zerlegt. Das Bleisulfid wurde abfiltriert und gut nachgewaschen, da es beträchtliche Mengen Ascorbinsäure adsorbieren kann. In das Filtrat leiteten wir nochmals Schwefelwasserstoff ein, um die Ausfällung des Bleis zu vervollständigen. Das Filtrat befreiten wir darauf durch einen CO_2-Strom vom Schwefelwasserstoff und bestimmten wiederum den Reduktionswert. Es mussten noch 792 mgr Ascorbinsäure vorhanden sein. Der Verlust ist hier grösstenteils auf das Adsorptionsvermögen des Bleisulfids zurückzuführen. Eine weitere

Reinigung erfolgte mit Phophorwolframsäurelösung. Bei kurzer Einwirkung von Phosphorwolframsäure sind die Verluste meist nicht sehr gross. Nach einiger Zeit jedoch färbt sich eine Phosphorwolframsäurelösung, die noch Ascorbinsäure enthält, blau, was wahrscheinlich auf eine Reduktion des 6-wertigen Wolframs zur 5-wertigen Verbindung zurückzuführen ist, wobei gleichzeitig die Ascorbinsäure oxydiert wird. Dann wurde eine weitere Bleifällung durchgeführt. Nach Ausfällen des Bleis mit Schwefelwasserstoff dampften wir die Lösung sorgfältig ein und erhielten ein klares, noch leicht gelblich gefärbtes Konzentrat, das aber titrimetrisch nicht mehr als 120 mgr Ascorbinsäure enthielt. Wir erhielten auch Kristalle, die sich aber nicht als reine Ascorbinsäurekristalle erwiesen. Verschiedene Reaktionen zeigten jedoch, dass noch Ascorbinsäure vorhanden sein musste.

Ausgeführte Reaktionen:

Ferrosulfatreaktion: Zu einigen ccm ascorbinsäurehaltiger Lösung wird gesättigte, frisch bereitete Ferrosulfatlösung gegeben, ferner etwas Kalziumkarbonat, so dass die Lösung schwach alkalisch wird. Nach einigem Stehen an der Luft tritt von der Oberfläche her eine Dunkelviolettfärbung auf, die nach längerem Stehen durch Bildung von Eisenhydroxyd braun wird. Einige Kristalle unserer Substanz in Wasser gelöst ergeben eine positive Ferrosulfatreaktion.

Furfurolreaktion: Ein paar mgr der ascorbinsäurehaltigen Substanz werden in 1—2 ccm konzentrierter Schwefelsäure erwärmt. Aufsteigende Dämpfe färben einen mit Anilin-Eisessig getränkten Filtrierpapierstreifen rot. Auch diese Reaktion war bei unserer Probe positiv.

Kakothelinreaktion: Das Bruzinderivat, Kakothelin, löst sich in Wasser mit gelber Farbe. Bereits sehr verdünnte Ascorbinsäurelösungen (1 : 50'000) ergeben mit einigen Tropfen Kakothelinlösung nach etwa 10 Minuten eine deutliche Lilafärbung. Nach Rosenthaler tritt die Färbung zwar auch bei Anwesenheit von Cystein und Glutathion auf, aber erst nach dem Erwärmen oder bei Zimmertemperatur nach mehrstündigem Stehen. Unsere Substanz ergab mit Kakothelin ebenfalls eine positive Reaktion.

Die weitere Aufarbeitung unserer ascorbinsäurehaltigen Substanz geschah nach einem ähnlichen Verfahren wie es Reichstein bei der Darstellung der Ketozuckersäuren aus den Osonen verwendete. Die Reinigung über das Bleisalz führte jedoch bei den ohnehin kleinen Mengen Ascorbinsäure zu keinem befriedigenden Resultat.

Der Versuch wurde wiederholt, diesmal durch Einnahme einer grösseren Menge Orangensaft. Es wurde so viel Orangensaft zugeführt, bis in 6600 ccm Urin 2503 mgr Vitamin C festgestellt wurden. Nach der Vorreinigung mit Methanol waren nach dem Reduktionswert noch 2016 mgr vorhanden, nach der Fällung als Beisalz und der Phosphorwolframsäure noch ungefähr 650 mgr. Weitere Reinigungen reduzierten den Gehalt noch mehr. Immerhin hätten noch gut 200 mgr Vitamin C vorhanden sein sollen, als wir die Ferrosulfatreaktion durchführten. Diese war aber negativ. Wir arbeiteten daraufhin noch einen Urin auf, bei welchem vorangehend ein Orangenkonzentrat eingenommen worden war, das titrimetrisch einen sehr hohen Gehalt an Vitamin C aufwies. Auch aus diesem Urin gelang es uns nicht, Ascorbinsäure zurückzugewinnen.

Nachdem unsere Versuche zum Ergebnis führten, dass nach Belastung mit synthetischer Ascorbinsäure diese zwar nicht rein aus dem Urin zurückgewonnen werden konnte, aber doch mit verschiedenen Reaktionen nachweisbar war, während trotz ebenso starker Anreicherung von natürlichem Vitamin C im Urin, bei letzterem die Reaktionen negativ ausfielen, suchten wir das Vitamin C nach kurzer Vorreinigung des Urins in eine stabile Verbindung überzuführen und als solche zu isolieren.

Als zuckerähnlicher Körper mit zwei zu Ketogruppen oxydierbaren Hydroxylgruppen hat die Ascorbinsäure die Fähigkeit, mit verschiedenen Hydrazinen Osazone zu bilden. Nach den Erfahrungen, die verschiedene Autoren bei der Bildung von Vitamin C-Osazonen gemacht hatten, schien es geeignet, die 2,4-Dinitrophenylhydrazinverbindung der Dehydroascorbinsäure herzustellen, da sich nur die Dehydroascorbinsäure zur Osazonbildung eignet.

Nachdem während einigen Tagen 3 Tabletten Redoxon eingenommen worden waren und titrimetrisch festgestellt werden konnte, dass der Urin eine erhöhte Reduktionskraft anzeigte, wurden innerhalb von zwei Tagen 5 gr l-Ascorbinsäure eingenommen und der Urin während drei Tagen gesammelt. Die Urinmenge von 3450 ccm wies einen Gehalt von 2437 mgr Ascorbinsäure auf.

Der Urin wurde sodann jeweils nach Ansäuren mit HCl und Sättigen mit Schwefelwasserstoff portionenweise bei vermindertem Druck und niedriger Temperatur frisch eingeengt. Nach weitgehender Konzentration, wie bei unseren vorangegangenen Versuchen, führten wir zur Ausfällung anorganischer Salze die Methanolfällung durch. Nach Abdestillieren des Methanols im Vacuum waren mit Dichlorphenolindophenol noch 1382 mgr Ascorbinsäure nachweisbar. Diese oxydierten wir nun mit einer 0,1 n-Jodlösung zur Dehydroascorbinsäure. Sodann säuerten wir das Konzentrat nochmals an, bis es einer 2,5 n-HCl entsprach. Nun lösten wir 10 gr 2,4-Dinitro-

phenylhydrazin in 2,5 n-HCl, filtrierten heiss und gaben die Lösung zur Dehydroascorbinsäure. Dieses Gemisch wurde während 4 Tagen im Brutschrank gehalten bei einer Temperatur von 40 Grad. Im Laufe dieser Zeit schied sich eine dunkelbraunrote Masse ab. Nach eintägigem Aufbewahren im Eisschrank wurde filtriert und der Rückstand zweimal mit 9 %iger Salzsäure ausgekocht, wobei sich unverändertes Dinitrophenylhydrazin löste. Der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen bis er frei von HCl war, dann mit kaltem Alkohol, und bei einer Temperatur von 70—80 ° getrocknet.

Zuerst extrahierten wir nun mit eiskaltem Alkohol, indem wir das Osazongemisch in der Schüttelmaschine mit Eiskühlung 1—2 Stunden schüttelten. Diese Operation wiederholten wir so oft, bis die anfänglich dunkelbraunen Filtrate nur noch gelb gefärbt waren. Der auf der Filternutsche befindliche Rückstand wurde jeweils noch mit eiskaltem Alkohol nachgewaschen. In gleicher Weise extrahierten wir noch mit Oxalester in der Kälte. Da das reine Dinitrophenylhydrazon der Ascorbinsäure in kaltem Alkohol und Oxalester nahezu unlöslich ist, während andere Verbindungen des Dinitrophenylhydrazins dabei in Lösung gehen, ist eine weitgehende Abtrennung des Vitamin-Osazons dadurch möglich, wie schon frühere Autoren feststellen konnten. Nach mehrmaligem Ausschütteln mit Oxalester erhielten wir eine blutrote Masse, die wir noch mit Alkohol auswuschen und trockneten. Der Schmelzpunkt der soweit gereinigten Substanz war 255 °. Jetzt extrahierten wir mit heissem Oxalester im Oelbad und filtrierten heiss ab. Der Rückstand wurde noch 2—3mal mit heissem Oxalester aufgenommen und nochmals bis zum leichten Sieden erhitzt und gesondert filtriert. Schliesslich blieb ein braunroter Rückstand zurück, der unter dem Mikroskop keine einheitliche Masse zeigte. Das erste Filtrat wurde auf etwa 5 ° abgekühlt und dann filtriert, mit Alkohol gewaschen und getrocknet und noch dreimal mit wenig Oxalester umkristallisiert, aber etwas gelinder erhitzt. Schliesslich erhielten wir eine ziemlich hellrote Substanz, die unter dem Mikroskop Kügelchen zeigte, woraus sich bei längerem Stehenlassen und leichtem Verdampfen des Oxalesters deutliche Sphärokristalle bildeten. Wir bekamen auch einen konstanten Schmelzpunkt von 275—276 ° unter Zersetzung. In gleicher Weise verarbeiteten wir den Harn nach Einnahme einer entsprechenden Menge Vitamin C in natürlicher Form. Zu diesem Zwecke wurde an zwei Versuchspersonen eine grössere Menge Orangensaft verabreicht. Aus diesem Urin erhielten wir nach dem angewandten Reinigungsverfahren ein Osazon mit einem Schmelzpunkt von 276—277 ° (Zersetzung).

Es wurde auch noch ein Urin aufgearbeitet, der das Vitamin C aus eingenommener Hagebuttenkonfitüre enthielt. Der Schmelz-

punkt der auf die gleiche Weise gewonnenen Substanz war gleich. Zur Kontrolle stellten wir noch ein Osazon aus reiner Ascorbinsäure her, bei dem die Vorreinigung mit Methylalkohol in salzsaurer Lösung wegfiel. Dieses schmolz bei 275 ° (Zersetzung). Der Mischschmelzpunkt von dem reinen Ascorbinsäureosazon mit dem aus den Urinen isolierten Osazonen erlitt keine Depression (275—276 °, Zersetzung). Alle Osazone ergaben nach dem Umkristallisieren aus Oxalester kugelige Gebilde (Sphäriten) (Abb. 1—3).

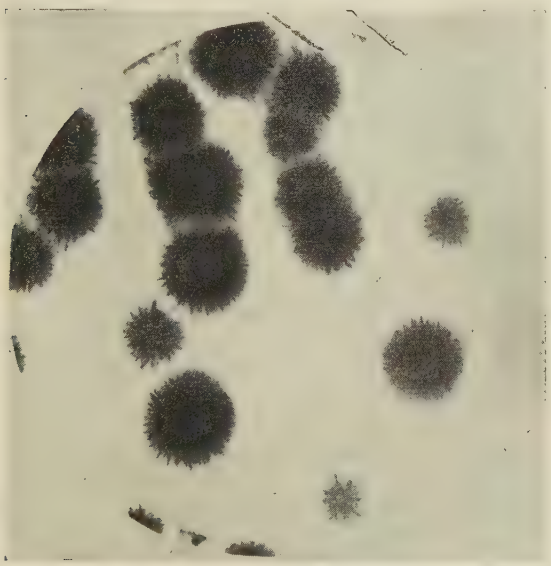


Abb. 1.
Sphärokristalle aus Oxalester. Dinitrophenylosazon aus reiner Ascorbinsäure.

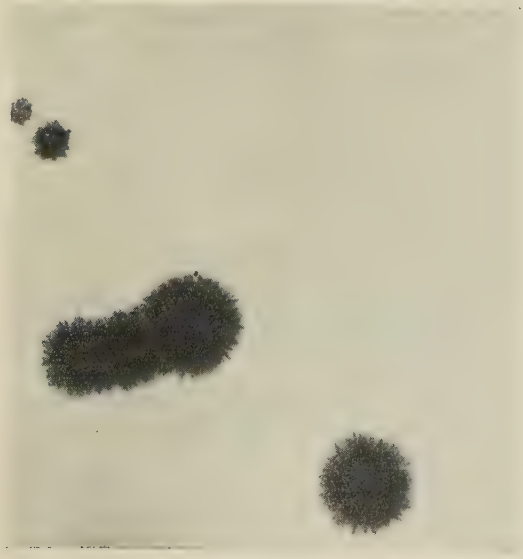


Abb. 2.
Sphärokristalle aus Oxalester. Dinitrophenylosazon aus dem Urin nach Redoxoneinnahme.

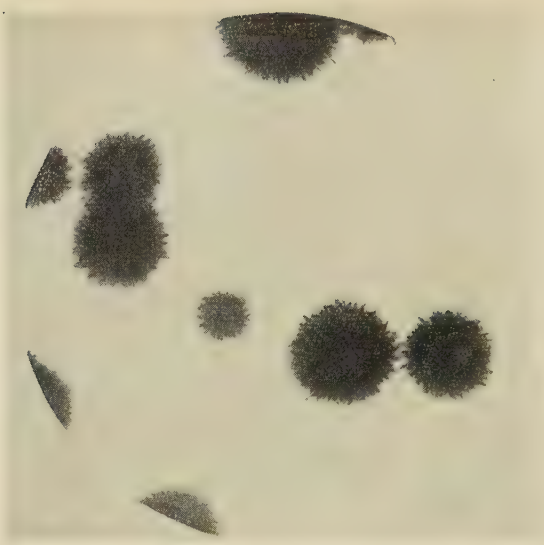


Abb. 3.
Sphärokristalle aus Oxalester. Dinitrophenylosazon aus dem Urin nach Einnahme von Orangensaft.

Aus Pyridin-Eisessig kristallisierten die Substanzen in Nadeln, meist in Büscheln. Bei den Nadeln handelt es sich um optisch zweiachsige Kristalle (s. Abbildungen 4—6).

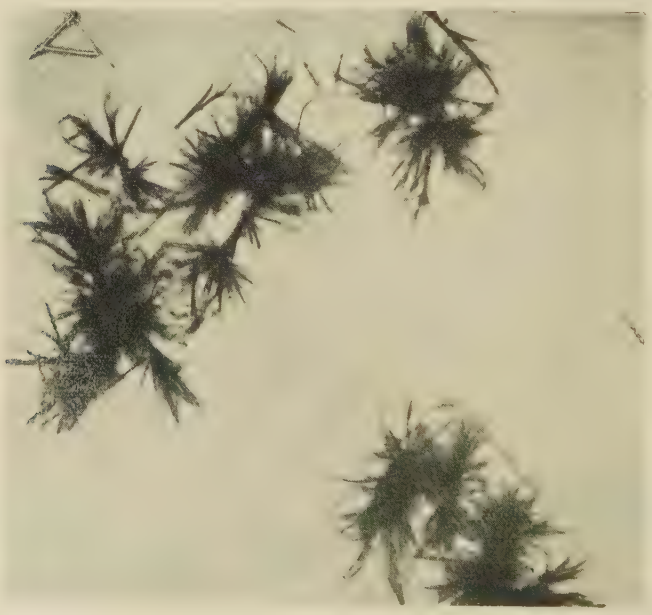


Abb. 4.
Büscheln aus Pyridin-Eisessig. Osazon aus reiner Ascorbinsäure.

Abb. 5.
Büscheln aus
Pyridin-Eisessig.
Aus dem Harne nach
Einnahme von
Redoxon.

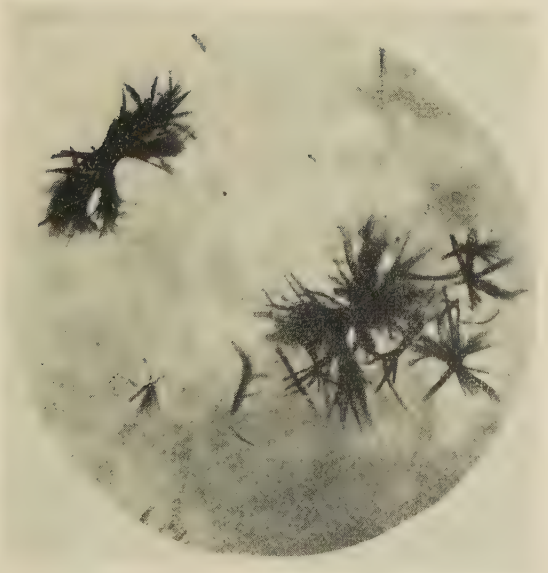


Abb. 6.
Büscheln aus
Pyridin-Eisessig.
Aus dem Harne nach
Einnahme von
Orangen.

Die C-, H- und N-Bestimmungen, vom analytischen Laboratorium an der E.T.H. in Zürich ausgeführt, ergaben folgende Werte:

	C	H	N
Osazon aus dem Urin nach Einnahme von Redoxon	41,61 %	3,01 %	20,13 %
Osazon aus dem Urin nach Einnahme von Orangensaft	42,55 %	3,26 %	20,51 %
Osazon aus dem Urin nach Einnahme von Hagebuttenkonfitüre	42,90 %	3,01 %	19,91 %
Reines Ascorbinsäureosazon (ohne Passage der Ascorbinsäure durch den Organismus und Wegfall der Vorreinigung)	40,35 %	2,60 %	20,50 %
Berechnet	40,44 %	2,62 %	20,97 %

Wir sehen, dass die Differenzen der Werte zwischen den aus den Urinen gewonnenen Osazonen und dem theoretischen Wert weit ausserhalb der Fehlergrenze liegen. (Auch bei Ammon und Hinsberg, sowie Drumm, Scarborough und Stewart finden Abweichungen von den theoretischen Werten statt.)

Da wir beim Aufarbeiten der Harne in der Vorreinigung Salzsäure und Methylalkohol in Anwendung brachten, war an ein methyliertes Produkt zu denken.

Dabei wären folgende Verbindungen möglich:

	C	H	N
$C_{19}H_{16}O_{12}N_8$	41,61 %	2,94 %	20,44 %
$C_{20}H_{18}O_{12}N_8$	42,71 %	3,23 %	19,93 %

Vergleichen wir diese Werte mit den von uns erhaltenen, so wäre das Vorhandensein von Methylverbindungen nicht ausgeschlossen. Die Methoxybestimmung, die wir mit einem aus dem Urin gewonnenen Redoxon-Osazon durchführen liessen, ergab auch, dass eine teilweise Methylierung stattgefunden hat.

Die weiteren Abweichungen sind wohl auf die Ueberdeckung mit einer ähnlichen Substanz zurückzuführen, da bereits Herbert und Mitarbeiter auf zwei mögliche Verbindungen des Dinitrophenylhydrazins mit der Dehydroascorbinsäure aufmerksam machen. Da bei der Reinigung mit grossen Verlusten gerechnet werden muss, verzichteten wir auf weitere Reinigungsmethoden der ohnehin kleinen Mengen Osazone.

Mit dem Rest der gewonnenen Osazone aus dem Harne nach Einnahme von Redoxon bzw. Orangensaft liessen wir im Mineralogischen Institut in Bern eine Röntgenuntersuchung vornehmen.

Verwendet wurde die Pulvermethode nach Debye-Scherrer-Hull (CuK-Röntgenstrahlung einer Siemens-Feinstrukturröhre, ni-Filter, 11 MA, 45 kV, Belichtungszeit 5 –6 Stunden, Pulver

in sog. Markröhrchen von 0,2 mm Durchmesser, Kameraradius 31,84 mm). Die beiden Osazone zeigen 25 scharfe, gut vermessbare Linien, die hinsichtlich Lage und relativen Intensitäten vollständig übereinstimmen. Herr Priv.-Doz. Dr. N o w a c k i, dem wir für die Untersuchung zu Dank verpflichtet sind, stellte fest, dass *in beiden Fällen dieselbe Substanz in ein und derselben kristallisierten Form vorliegt* (s. Abbildungen 7 und 8).

Röntgenogramme nach Debye-Scherrer-Hull

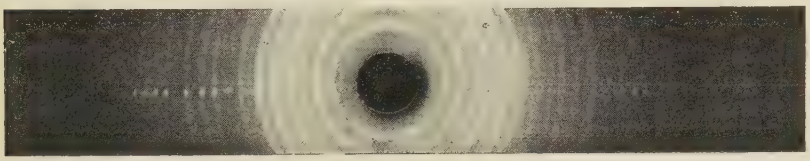


Abb. 7.
Osazon aus dem Harne nach Einnahme von Orangensaft

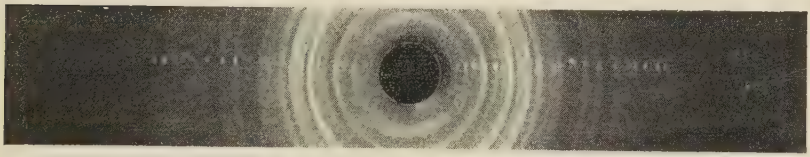


Abb. 8.
Osazon aus dem Harne nach Einnahme von Redoxon

Zusammenfassung.

Nach den Angaben von W i e t e r s war es uns nicht möglich, nach Belastung mit Redoxon bzw. Orangensaft das Vitamin C aus dem Harne kristallinisch darzustellen.

Nach Einnahme von Redoxon zeigte der Harn mit der Furfurol- und andern Reaktionen die Anwesenheit von Vitamin C, was beim Harne nach Belastung mit Orangensaft nicht der Fall war.

Hingegen ist es uns gelungen, aus den beiden Harnen Dinitrophenylosazone herzustellen, die in allen Fällen den gleichen Schmelzpunkt und die gleichen Kristallisationsformen ergaben. Auch der Mischschmelzpunkt erleidet keine Depression.

Wir dürfen mit grösster Wahrscheinlichkeit annehmen, dass sowohl nach Redoxonbelastung wie auch nach Einnahme der gleichen Menge Vitamin C in natürlicher Form aus dem Urin der gleiche Stoff ausgeschieden wird. Wir können aus diesen Versuchen nicht aussagen, ob nicht eventuell im Organismus die beiden Stoffe in

einer andern Form oder Bindung kreisen, im Sinne etwa von Lund, der die Ascorbinsäure als eine Vorstufe des Vitamins C ansieht. *Aber ausgeschieden werden wahrscheinlich identische Stoffe.* Für die Identität des natürlichen und synthetischen Vitamins glauben wir auf diese Weise einen weiteren Beweis geliefert zu haben.

III. Ueber den Einfluß von synthetischem und natürlichem Vitamin C auf das Pflanzenwachstum

Während der Durchführung der früher geschilderten Versuche sind wir in der Literatur auf die Arbeiten von van Hausen, wie auch von Virtanen und van Hausen gestossen, in welchen gezeigt wurde, dass „das Vitamin C für höhere Pflanzen ein unentbehrlicher Wachstumsfaktor ist". Wenn dem so wäre, hätten wir in der Pflanze ein ausgezeichnetes Reagens zur Prüfung der Identität der beiden Vitamin C-Arten. Ist das Vitamin C wirklich unentbehrlich, so müsste die Pflanze genau gleich reagieren, wenn wir ihr das natürliche oder das synthetische Vitamin C zuführen, falls die beiden Vitamin C-Arten identisch sind.

Um solche Versuche durchzuführen, muss man der Pflanze vor allem ihre Reservebehälter wegnehmen, um die Mitwirkung bereits vorhandener Wuchsstoffe auszuschalten. Dazu eignen sich cotyledonen- und endospermlose Keimlinge.

Die ersten Versuche dieser Art dürften wohl von Bonnet um die Mitte des 18. Jahrhunderts gemacht worden sein. Er hatte Phaseolus multiflorus und Fagopyrumsamen in Gartenerde ausgesät und nach dem Keimen die Kotyledonen entfernt. Von besonderer Bedeutung für spätere Arbeiten waren die Versuche von Brown und Morris (1890). Diese Autoren haben Gerstenkeimlinge vom Endosperm abgetrennt und auf Gelatine gezüchtet. In der Folge wurden von verschiedenen Autoren eine ganze Reihe von Arbeiten mit isolierten Keimlingen durchgeführt.

Die Prüfung von Stoffen auf ihre wachstumsfördernde Wirkung zeigte, dass solche Untersuchungen nur steril durchgeführt zu sicheren Resultaten führen, da sonst ein unkontrollierbarer Wuchsstoffaustausch stattfinden kann. Auch bei der Verwendung von künstlich dargestellten Nährböden brachte man in Erfahrung, dass ein anorganisches Nährmedium nicht genügt, um die Pflanze zur Ent-

wicklung zu bringen, und dass für den Keimling wenigstens Zucker notwendig ist. Bei den Versuchen von Brown und Morris zeigte sich, dass Rohrzucker für die Pflanze einen Nährwert besass, während das bei einem Zusatz von Milchzucker zum anorganischen Nährmedium nicht der Fall war.

Ray hatte ebenfalls Pflanzenkeimlinge auf sterilen Nährböden mit verschiedenen Zuckern kultiviert und dabei die Vitamin C-Produktion der Embryonen untersucht.

Nach den bestehenden Erfahrungen sind nicht alle Zucker in gleicher Weise geeignet. Für Erbsensorten waren als brauchbar befunden worden: Saccharose, Maltose, Mannose, Glukose und Lävulose. Andere Zucker sowie höhere Alkohole schienen nicht günstig zu wirken. Rytz fand Glukose für seine Versuche als den zuverlässigsten Zucker. Mit Bezug auf die Konzentration machte er Zusätze von 2, 3. 5 und 10 % zur Nährsubstanz und fand bei 5 % die optimale Wirkung auf den Gesamthabitus der Pflanze. Anders verhielt es sich mit dem Trockengewicht; hier erreichte er die besten Resultate mit 10 % Glukose.

Untersuchungen über die pflanzenphysiologische Bedeutung der Vitamine wurden besonders für Vitamin B_1 und Vitamin C durchgeführt. Kögl und Haagen-Smit haben bei ihren Wachstumsversuchen mit Biotin auch solche mit Aneurin und Ascorbinsäure gemacht. Sie fanden, dass Ascorbinsäure auf das Wachstum cotyledonenloser Erbsenembryonen unwirksam war. Dieses Resultat war im Gegensatz zu den früher zitierten Ergebnissen von Havas, Virtanen und van Hausen.

v. Hausen legte sterile Kulturen von Erbsensamen an, die in der Nährlösung kleine Mengen von Ascorbinsäure zugesetzt enthielten. Dabei konnte er zuerst beobachten, dass die Pflanzen auf das Vitamin C in Nährlösungen einen stabilisierenden Einfluss hatten, denn nach Beendigung der Versuche war noch ein Rest von Ascorbinsäure in den Kulturgefässen nachweisbar, während in gleichen Gefässen, die keine Pflanzen enthielten, schon im Laufe eines Tages fast die gesamte Menge des Vitamnis C zerstört war. Demnach nahm er an, dass aus den Wurzeln der jungen Pflanzen das Vitamin C stabilisierende Stoffe in die Lösung diffundieren. Ferner zeigten seine Pflanzen mit Vitamin C-Zusatz eine Erhöhung des Trockengewichtes (unter Umständen bis zu 100 % der Kontrollen), des Längenwachstums und des Gehaltes an Vitamin C. Die günstigste Zeit für den Zusatz fand er vor Beginn der Blüte, ein späterer Zusatz hatte keinen Einfluss mehr auf das Wachstum. Da in dieser Versuchsanlage die Pflanzen bereits vor der Zufuhr einen Eigengehalt des Vitamins aufweisen, suchte van Hausen in weiteren Kulturen nach der bereits angeführten Methode und Zucht cotyle-

donenloser Keimlinge den Eigengehalt an Vitamin C weitgehend auszuschalten. Dadurch waren die Pflanzen mehr auf die zugesetzte Ascorbinsäure angewiesen. Die Erbsensamen liess er erst 2—9 Tage keimen, dann wurden ihnen die Cotyledonen weggeschnitten. Auch hier beobachtete er eine phytohormonale Wirkung der Ascorbinsäure durch eine Begünstigung des Wachstums gegenüber der Kontrolle.

Aus diesen Ergebnissen zog van Hausen den Schluss, dass das Vitamin C für höhere Pflanzen ein unentbehrlicher Wachstumsfaktor sei.

Bonner und Axtmann und Bonner J. und Bonner D. untersuchten neben Aneurin und Follikulin ebenfalls die Wirkung von Ascorbinsäure auf das Wachstum cotyledonenloser Keimlinge und stellten eine fördernde Wirkung der Ascorbinsäure fest. Aus der Arbeit von Rytz geht hervor, dass Ascorbinsäure auf das Wachstum der Pflanze sowohl einen hemmenden Einfluss ausüben, wie auch eine Förderung des Wachstums bewirken kann, je nachdem ob bei der Anlage der Kulturen bestimmte Faktoren berücksichtigt werden oder nicht. Einmal spielt die Wahl der Erbsensorte selber eine Rolle. Bereits James und D. Bonner (1938) hatten gezeigt, dass Erbsensorten mit hohem Vitamin C-Gehalt nicht stark reagieren, wenn ihnen dieser Stoff in der Nährlösung noch zugegeben wird. Die jungen Pflanzen können sich demnach wirkstoffautotroph ernähren. Andere Sorten dagegen, die bloss über kleine Vitamin C-Reserven verfügen und im ersten Entwicklungsstadium des Keimlings auch nur wenig davon bilden, reagieren deutlicher, wenn sie diesen Faktor zusätzlich erhalten. So fand Rytz die Erbsensorte „Prinz Albert" reich an wirksamen Substanzen. Gezüchtete Keimlinge dieser Sorte konnten ohne einen zusätzlichen Wirkstoff zum Blühen gebracht werden, was bei andern Sorten wie „Express"-Erbsen nur selten und bei „Aldermann" überhaupt nicht der Fall war. Im weitern ist auch der Zeitpunkt des Entfernens der Keimblätter für das Resultat ausschlaggebend. Van Hausen hat erst nach sieben, bezw. neun Tagen die Cotyledonen entfernt, somit in einem Zeitpunkt, in dem bestimmt schon beträchtliche Mengen Vitamin C in den Keimling übergegangen waren. Rytz dagegen suchte dieses zu vermeiden und entfernte die Keimblätter bereits als er sie erst 6 Stunden quellen gelassen hatte. Um dem Vorwurf zu begegnen, dass sich schon in den ersten sechs Stunden des Quellenlassens bedeutsame Entwicklungsvorgänge im Keimling abspielen, hat Rytz auch versucht, aus trockenen Erbsen die Embryonen zu isolieren, was ihm auch gelungen ist. In der Kultur zeigten diese erst eine Verzögerung im Wachstum, nach einem Monat hatten sie sich ebenfalls zu jungen Pflanzen entwickelt,

jedoch war ihre Sprosslänge nur halb so gross wie diejenige der aufgeweicht herauspräparierten Keimlinge, dafür aber wiesen sie ein 10 % höheres Trockengewicht auf. In den ersten Versuchen, die Rytz mit Ascorbinsäure machte, fand er, dass diese eher hemmend als fördernd auf das Wachstum wirke. Sein Versuchergebnis wurde aber umgekehrt, als er die Ascorbinsäure nur in sehr geringen Dosen (0,5 mgr pro Keimling) dem Nährmedium zugab und gleichzeitig auch die Glukosezentration erniedrigte. Unter diesen Bedingungen konnte er bei jungen Erbsenpflanzen der Sorte „Express" eine Erhöhung der Sprosslänge und der Trokkengewichte beobachten.

Unsere Versuchsanordnung

Als synthetisches Vitamin C bedienten wir uns der handelsüblichen Ascorbinsäure (Roche), während die Zusätze von natürlichem Vitamin C aus Fruchtsaft bestanden. Da diese Pflanzenextrakte noch andere Stoffe enthalten können, deren wachstumsfördernde Wirkung uns unbekannt ist, haben wir durch Entfernen des einen oder andern Stoffes die Nebenwirkungen der Begleitstoffe zum Teil ausschalten können.

In der Anlage steriler Kulturen von cotyledonenlosen Embryonen bedienten wir uns der von Rytz gemachten Angaben. Als Versuchpflanze wählten wir ebenfalls Erbsen (Pisum sativum), und zwar der Sorte „Aldermann", die wie Rytz festgestellt hatte, wenig Wirkstoff-Autotrophie aufweisen. Diese Erbsen wurden zuerst in 90 %igem Alkohol mit einer 0,3 %igen Sublimatlösung behandelt, achtmal hintereinander in sterilem Wasser gewaschen und darauf ungefähr 10 Stunden in ebenfalls sterilem Wasser quellen gelassen. Nun wurden die Keimlinge unter Wasser von der Samenschale und den Keimblättern befreit. Trotz den sterilen Vorsichtsmassregeln bei der Isolierung der Keimlinge, können diese noch nicht als vollständig bakterienfrei betrachtet werden. Klein und Kisser beschreiben mehrere Desinfektionsmethoden für Pflanzenkeimlinge. Nach den gemachten Erfahrungen eignet sich eine verdünnte Bromlösung sehr gut. Die Embryonen wurden daher mit einer 1 %igen Bromlösung 3 Minuten lang behandelt und hierauf mehrmals mit sterilem Wasser gespült. Diese Keimlinge wurden dann auf die bereit gehaltenen Nährböden verpflanzt.

Als Nährmedium benützten wir die von van Hausen angewandte und auch von Rytz für Erbsen als geeignet befundene Hiltner-Lösung. Sie besteht aus:

H_2O	1000 ccm
KCl	0,25 gr
$Ca_3(PO_4)_2$	0,25 gr
$CaSO_4 \cdot 2\,H_2O$	0,25 gr
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,39 gr
$Ca(NO_3)_2$	1,0 gr
$CaCO_3$	1,0 gr
$FECl_3$ sol. 5 %	3,0 gtt.
Glukose	5 %

Um den Keimlingen den nötigen Halt zu geben, wurde dem Nährmedium 1,75 % Agar zugesetzt. Gibt man mehr Agar zu, so wird der Nährboden zu fest und die feinen Wurzeln der keimenden Pflanze vermögen ihn nicht zu durchdringen. Die heisse Nährlösung wurde filtriert bezw. kolliert und dann zu je 30 ccm auf Gläser von ca. 16 cm Länge und 3 cm Durchmesser verteilt, die mit einem Wattepfropfen verschlossen wurden. Die so hergestellten Nährböden wurden bei 120° 30 Minuten lang sterilisiert. Waren die Stoffe, die wir zur Untersuchung auf ihre Wachstumswirkung zusetzten, hitzeempfindlich, so setzten wir sie erst kurz vor dem Erstarren des Nährbodens zu, unter Beachtung aseptischer Kautelen, andernfalls wurden sie mitsterilisiert, besonders, wenn wir die Zerstörung eines bestimmten, hitzeempfindlichen Faktors beabsichtigten. Mit einer sterilen Pinzette trugen wir dann die desinfizierten Keimlinge auf die Nährböden. Die Kulturgläser wurden in einem Gewächshaus untergebracht, wo sie genügend Licht und eine ziemlich konstante Temperatur von ungefähr 20° hatten (s. Abb. 9).

Weissenböck K. und Weissenböck M. hatten festgestellt, dass keine direkten Zusammenhänge zwischen der Ascorbinsäurebildung und den Vorgängen der Photosynthese bestehen, und dass demnach die Ascorbinsäure kein unmittelbares Assimilationsprodukt darstellt.

Nach den Stoffen, die auf ihre Wachstumsbeeinflussung geprüft werden sollten, teilten wir die Kulturgläser in verschiedene Serien auf. In den ersten Versuchen, die nur als Vorversuche zu bewerten sind, hatten wir 4 Reihen zu je 20 Gläser.

1. Serie: Erhielt 2 ccm steriles Wasser zum Nährmedium zugesetzt und diente als Kontrolle.
2. Serie: 2 ccm 50 mg %ige Ascorbinsäurelösung = 1 mg Ascorbinsäure pro Kulturgefäss.
3. Serie: 2 ccm steril filtrierten Orangensaft, der auf 50 mg % Vitamin C eingestellt worden war.
4. Serie: 2 ccm Orangensaft, dem durch Luft und starkes Erhitzen im Autoklav das Vitamin C zerstört wurde, soweit dies titrimetrisch feststellbar ist.

In diesen Versuchen zeigten in Bezug auf Spross- und Wurzellängen das beste Wachstum jene Pflanzen, die als Zusatz steril filtrierten Orangensaft erhalten hatten. Ein fast ebenso gutes Wachstum wurde mit autoklaviertem Orangensaft erzielt. Dagegen war zwischen den Kontrollpflanzen und denen mit Ascorbinsäure kein Wachstumsunterschied zu verzeichnen. Diese beiden Serien zeigten ein sehr zwerghaftes Gedeihen der Keimlinge.

In unseren darauf folgenden Versuchen schalteten wir noch weitere Serien ein. Neben den wie in den Vorversuchen angelegten vier Untersuchungsreihen wurde noch Orangensaft zugegeben, dem ausser dem Vitamin C auch das Vitamin B_1 entzogen war, indem wir ihn mit Tierkohle kochten und ausschüttelten. Eine weitere Versuchsanordnung enthielt in gleicher Weise vorbehandelten Orangensaft, dem das zerstörte Vitamin C durch Zugabe einer äquivalenten Menge Ascorbinsäure ersetzt worden war.

Auch stellten wir ein Wasserdampfdestillat aus Orangen her und setzten Ascorbinsäure zu. Schliesslich untersuchten wir noch, wie Ascorbinsäure mit Hesperidin zusammen auf das Wachstum von Keimlingen wirkte.

Das Hesperidin, ein Glykosid aus der Flavanonreihe, kommt in verschiedenen Früchten, so auch in der Schale und im Saft von Orangen vor. Es wird ihm neben andern Glykosiden der gleichen Reihe Vitamin P-Wirkung zugeschrieben. Szent-Györgyi und Mitarbeiter hatten beobachtet, dass der experimentelle Skorbut von Meerschweinchen durch alleinige Gabe von reiner l-Ascorbinsäure nicht geheilt werden kann, sondern erst durch Zufütterung von Zitronensaft, als dessen wirksamer Bestandteil der P-Faktor angesehen wurde. Dagegen soll der Vitamin P-Mangel in der Nahrung beim Tier keine klinisch nachweisbaren Erscheinungen hervorrufen. Diese treten erst auf, wenn gleichzeitig das Vitamin C fehlt. Zilva und ferner auch Th. Moll und W. Küssner haben verschiedene Glykoside, unter anderem auch das Hesperidin für sich und mit Ascorbinsäure zusammen biologisch untersucht. Wenn sie auch mit Hesperidin in Kombination mit unterschwelligen Dosen Ascorbinsäure eine Abschwächung des Krankheitsbildes beobachteten gegenüber den Kontrolltieren, die nur Ascorbinsäure erhielten, so fanden sie diesen Unterschied als zu wenig spezifisch und nicht der Wirksamkeit entsprechend, die dem Vitamin P zugeschrieben wird.

In unseren pflanzenphysiologischen Versuchen arbeiteten wir mit gleichen Mengenverhältnissen von Hesperidin zu Ascorbinsäure, wie sie in den Tierversuchen angewendet worden waren, und suchten zu beobachten, ob ein verbessertes Wachstum der Pflanzen festzustellen sei, die neben der Ascorbinsäure noch Hesperidin erhielten

gegenüber der Versuchsreihe, die zusätzlich nur Ascorbinsäure erhalten hatte.

Die Pflänzchen, die wir in den Vorversuchen gezüchtet hatten, liessen wir drei Monate wachsen, indessen waren nach und nach einige Nährböden durch Pilze infiziert worden, sodass das Wachstumsergebnis nicht mehr eindeutig auf die zugesetzten Stoffe allein zurückzuführen war. Die weiteren Versuche beschränkten wir auf 27 Tage, weil sich in dieser Zeit bereits Wachstumsunterschiede sichtbar machten, und allmählich das eine oder andere Kulturglas infolge Pilzinfektion ausgeschaltet werden musste.

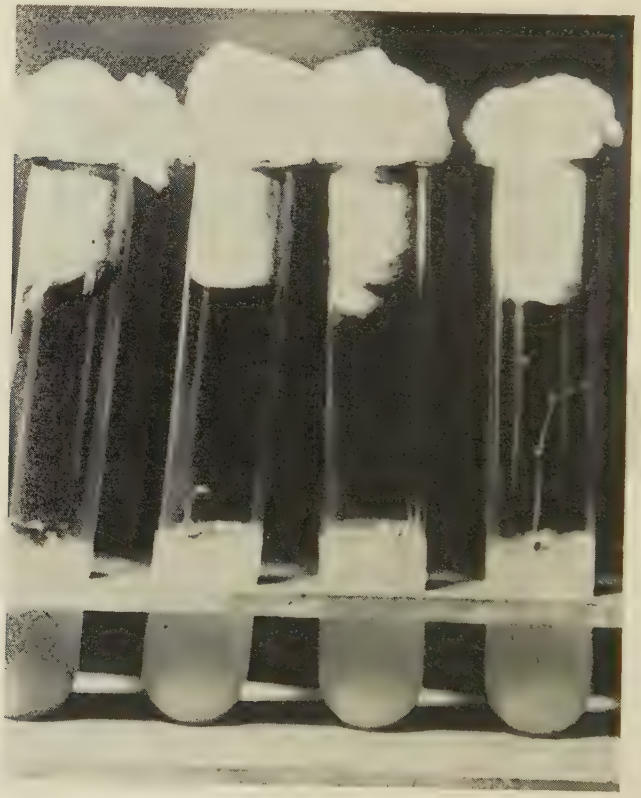


Abb. 9.
Kulturgefässe mit Pisum-Pflänzchen.

Die jungen Pflänzchen wurden sorgfältig den Kulturgläsern entnommen und von jedem einzelnen die Sprosslänge, die Gesamtwurzellänge, Frischgewicht und Trockengewicht bestimmt.

In folgender Aufstellung sind die durchschnittliche Spross- und Wurzellänge, sowie das durchschnittliche Frisch- und Trockengewicht jeder Versuchsreihe angegeben:

Serie K: Die Kontrollpflanzen erhielten 5 ccm steriles Wasser dem Nährmedium zugesetzt. Von den 10 ausgesetzten Keimlingen hatten sich zwei nicht weiter entwickelt und ein Nährboden war durch Pilze infiziert worden. Anzahl der für den Versuch in Betracht gezogenen Pflanzen: 7.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	6,5 mm
„ „	Wurzellängen:	14 mm
„ „	Frischgewichte:	20,85 mg
„ „	Trockengewichte:	5,81 mg

Serie A: Erhielt pro Keimling 5 ccm einer 20 mg %igen Ascorbinsäurelösung. Ein Keimling nicht weiter entwickelt. Anzahl der in Berechnung gezogenen Pflanzen: 9.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	4,3 mm
„ „	Wurzellängen:	14,6 mm
„ „	Frischgewichte:	26,6 mg
„ „	Trockengewichte:	3,66 mg

Serie C: Erhielt pro Keimling 5 ccm eines durch Bakterienfilter filtrierten Orangensaftes, eingestellt auf 20 mg % Vitamin C. Ein Keimling nicht gewachsen, 2 Nährböden infiziert, Anzahl der Pflanzen somit 7 (s. Abb. 10).

Durchschnitt der	Sprosslängen:	16,7 mm
„ „	Wurzellängen:	32,5 mm
„ „	Frischgewichte:	26,6 mg
„ „	Trockengewichte:	3,66 mg

Abb. 10.

Serie E: Erhielt pro Keimling 5 ccm Orangensaft, in dem durch Luft und Hitze das Vitamin C zerstört worden war. Ein Nährboden infiziert. Anzahl der Pflanzen somit 9.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	4	mm
„ „	Wurzellängen:	20	mm
„ „	Frischgewichte:	64,4	mg
„ „	Trockengewichte:	9,33	mg

Serie O: Erhielt pro Keimling 5 ccm Orangensaft, dem durch Luft und Erhitzen das natürliche Vitamin C zwar zerstört worden war, aber durch Zugabe von 1 mg Ascorbinsäure wieder ersetzt wurde. Eine Nichtkeimung, eine Infektion. Anzahl der Pflanzen: 8.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	8,3	mm
„ „	Wurzellängen:	22,5	mm
„ „	Frischgewichte:	49,1	mg
„ „	Trockengewichte:	8,6	mg

Serie T: Erhielt pro Keimling 5 ccm Orangensaft, dem ebenfalls das Vitamin C zerstört worden war und zugleich durch Ausschütteln und Kochen mit adsorbierender Kohle auch das Vitamin B_1 entzogen war. Eine Pflanze nicht gegekeimt. Anzahl der Pflanzen: 9.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	33,3	mm
„ „	Wurzellängen:	64,3	mm
„ „	Frischgewichte:	63,1	mg
„ „	Trockengewichte:	12,7	mg

Serie S: Erhielt pro Keimling 5 ccm in gleicher Weise vorbehandelten Orangensaft wie Serie T, jedoch wurde hier das Vitamin C wiederum durch Zugabe von 1 mg Ascorbinsäure pro Keimling ergänzt. 2 Keimlinge entwickelten sich nicht und 1 wurde durch Infektion ausgeschaltet, somit waren noch 7 Pflanzen.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	13,8	mm
„ „	Wurzellängen:	42,1	mm
„ „	Frischgewichte:	68,5	mg
„ „	Trockengewichte:	10,3	mg

Serie D: Erhielt 1 mg Ascorbinsäure gelöst in 5 ccm steril filtriertem Wasserdampfdestillat aus Orangen. 2 Keimlinge nicht gediehen. Total der in Berechnung gezogenen Pflanzen: 8.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	20,6	mm
„ „	Wurzellängen:	30,6	mm
„ „	Frischgewichte:	61,5	mg
„ „	Trockengewichte:	9	mg

Serie P: Erhielt 5 ccm einer 20 mg %igen Ascorbinsäurelösung, in der noch 10 mg Hesperidin aufgeschwemmt waren. Von dieser Serie hatten alle Keimlinge sich entwickelt, jedoch mussten 3 wegen Infektion ausgeschaltet werden. In Berechnung fallende Pflanzen somit 7.

Durchschnitt der	Sprosslängen:	14,5 mm
„ „	Wurzellängen:	20,0 mm
„ „	Frischgewichte:	46 mg
„ „	Trockengewichte:	9 mg

Tabelle 3.

Infolge technischer Schwierigkeiten war es uns nicht möglich, die Versuche an einer grösseren Anzahl Pflanzen durchzuführen. Da aber diese Untersuchungen für unser Problem nur einen Nebenbefund darstellen sollten, glaubten wir dennoch, die Untersuchung auch mit den wenigen Pflänzchen anstellen zu können. Dies umsomehr, als ausgehend von der Meinung v a n H a u s e n s, falls das Vitamin C wirklich einen Wachstumsfaktor für die Pflanze darstellen sollte, wir unsere Resultate auch mit den wenigen Versuchen sollten erzielen können *).

Zusammenfassung.

Es wurde ein Versuch mit cotyledonenlosen Embryonen ausgeführt, um festzustellen, ob Ascorbinsäure das Pflanzenwachstum gleich beeinflusse wie das natürliche Vitamin C. Der Versuch wurde im Anschluss an die Angaben von v a n H a u s e n bezw. von v a n

*) Herr Prof. Dr. S c h o p f e r war so freundlich, mir in seinem Laboratorium einen Arbeitsplatz zur Verfügung zu stellen. Dafür, wie auch für das Interesse, das er meinen Untersuchungen bekundet hatte, sei ihm an dieser Stelle bestens gedankt. Dank schulde ich auch Herrn Dr. M ü l l e r für die tatkräftige Unterstützung meiner Untersuchungen.

Hausen und Virtanen vorgenommen, welche die Behauptung aufgestellt haben, dass das Vitamin C für das Pflanzenwachstum unentbehrlich sei.

Unsere Untersuchungen haben diese Behauptung nicht bestätigen können, und zwar in Wachstumsversuchen mit Erbsen (Pisum sativum) „Sorte Aldermann". Bei anderen Pflanzenarten mögen die Verhältnisse anders liegen.

Dieser negative Befund bringt auch die aus den Untersuchungen zu resultierenden Schlussfolgerungen in Wegfall. Vielmehr ergaben unsere Untersuchungen, dass in den Gefässen, zu welchen die synthetische Ascorbinsäure zugesetzt worden war, kein besseres Wachstum zu sehen war, als in den Kontrollröhrchen. Da Fruchtsäfte oder Wasserdampfdestillate aus Früchten ein besseres Wachstum als die Kontrollen bewirkten, und zwar sogar dann, wenn wir die Ascorbinsäure in den Säften zerstört haben, scheint es, dass andere, unbekannte Faktoren mit im Spiel sein können.

Infolge der uns genau umschriebenen Problemstellung, aber auch wegen der geringen Versuchsanzahl sind wir auf diese Verhältnisse nicht näher eingetreten.

Schlußwort

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Identität des synthetisch dargestellten Vitamins C, der Ascorbinsäure, mit dem in den Früchten vorkommenden natürlichen Vitamin C festzustellen. Die Versuche wurden an Pflanzen, Menschen und Tieren ausgeführt.

Die Versuche an Pflanzen wurden vorgenommen, weil einige Autoren die Behauptung aufgestellt haben, dass das Vitamin C für das Pflanzenwachstum unentbehrlich sei. Bei der von uns verwendeten Pflanze Pisum sativum, Sorte Aldermann, scheint diese Behauptung für das erste Wachstumsstadium nicht zu stimmen.

Nimmt man grössere Vitamin C-Mengen ein, so wird nach Auffüllung der Depots der Ueberschuss ausgeschieden, welcher im Harne mit der Dichlorphenolindophenolreaktion titrimetrisch gemessen werden kann. Die Ausscheidung beim Menschen und beim Versuchstier verläuft nicht linear, sondern vielmehr schwankend. Beim Vergleich der beiden Ausscheidungskurven, nach Einnahme von Redoxon bezw. Orangensaft in der entsprechenden Vitamin C-Menge, kann man in den rhythmischen Ausscheidungskurven keinen Anhaltspunkt für ein unterschiedliches Verhalten feststellen.

Aus dem menschlichen Harne war es uns möglich, nach Einnahme der beiden Vitamin C-Arten, mit Dinitrophenylhydrazin Osazone herzustellen, die in beiden Fällen, nach Redoxon wie auch nach Orangensaft, genau gleich waren. Die beiden Vitosazone stimmen im Schmelzpunkt, Kristallisation usw. vollständig überein und auch die röntgenographische Bestimmung ergab, dass in beiden Fällen die gleichen Stoffe ausgeschieden werden.

Unsere Untersuchungen haben den Beweis geliefert, dass sowohl nach Einnahme des synthetischen Vitamins C wie auch nach Genuss des natürlichen Vitamins C in Form von Fruchtsäften aus dem Organismus chemisch gleiche Osazone isoliert werden können. Wir glauben, einen weiteren Beweis für die chemische Identität der beiden Vitamin C-Arten geliefert zu haben.

Literaturnachweis

Alter, Hippokrates 1941, **45**, 1150; Münch. med. Wschr. 1941, **28** 779. — *Ammon*, Biochem. Z. 1936, **288**, 93. — *Ammon & Hinsberg*, Biochem. Z. 1936, **288**, 102; Die med. Welt, 1935, **20**. — *Antener*, Helv. chim. acta 1937, XX, 742. — *Baumann*, Klin. Wschr. 1937, II, 1246. — *Baumann & Rappolt*, Z. Vitaminf. 1937, **6**, 1. — *Bezssonoff:* Bull. Soc. Chim. biol. 1927 (zit. nach Bomskov). — *Bomskov*, Methodik d. Vitaminforsch. Verlag Thieme. — *Bonner & Axtman*, Proc. Nat. Acad.-Sci. 1937, **23**, 453. — *Bonner & Bonner*, Proc. Nat. Acad. Sci. 1938, **24**, 70. — *Bottomley*, Proc. R. Soc. Ser. B. 89. — *Brown & Morris*, J. Chem. Soc. London, 1890, **57**, 485 — *Demole*, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 1933, **217**, 83. — *v. Drigalski*, Z. Vitaminf. 1935, **4**, 128. — *Elmby & Warburg*, Lancet 1937. — *v. Eekelen*, Z. Vitaminf. 1938, **7**, 245. — *v. Eekelen, Emmerie & Wolff*, Z. Vitaminf. 1937, **6**, 150. — *v. Euler*, Ark. Kemi. Miner. Geol. 1933, **11**, No. 19, zit. b. Bomskov. — *v. Euler & Klussmann*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 1933, **219**, 215. — *Ferrand & Policard*, Klin. Wschr. 1937, I, 347. — *Franke*, Z. klin. Med. 1938, **135**, 283. — *Fujita & Ebihara*, Tokio izi simi, 1936, No. 3010, zit. b. Nagayama. — *Gander*, Studien über den Vitamin C-Stoffwechsel im Militär, Manuskript 1937. — *Gander & Niederberger*, Münch. med. Wschr. 1936, **34**, 1386. — *Gstirner*, Chem. Vitamin-Bestimmungsmethoden, Verlag Enke, Stuttgart 1939. — *Guha & Pol*, Nature, London, 1936, **137**, 946. — *Guha & Sen Gupta*, Nature, London, 1938, **141**, 974. — *Hahn*, Klin. Wschr. 1937, I, 23 und Z. Kinderheilk. 1935, **57**, 442. — *Hamel*, Klin. Wschr. 1937, II, 1105. — *Harris & Ray*, Biochem. J. 1933, **27**, 303. — *v. Hausen*, Biochem. Z. 1936, **288**; Annales Acad. Sci. Fenniae 1936; Nature, London, 1935, **136**, 516. — *Hacas*, Nature, London, 1935, **136**, 435. — *McHenry & Graham*, Biochem. J. 1935, **29**, 2013. — *Herbert, Hirst, Percival & Smith*, Chem. Z. 1933, 3871. — *Holmes & Campbell*, Chem. Z. 1939, 2102. — *Holtz & Reichel*, Klin. Wschr. 1940, I, 461. — *Holtz & Walter*, Klin. Wschr. 1940, I, 136. — *Jezler & Kapp*, Zschr. klin. Med. 1936, **130**, 186. — *Kirchmann*, Ergebn. inn. Med. u. Kinderheilk. 1939, **56**, 107. — *Klein & Kisser:* Fischer, Jena Bot. Abh. H. 2, 1935. — *Klodt*, zit. n. Savelsberg. — *Kögl & Haagen-Smit*, Hoppe-Seylers Z. physiol. chem. — *Kramer*, Dtsch. Militärarzt 1937, **2**, 489. — *Kröner & Steinhoff*, Biochem. Z. 1937, **294**, 138. — *Kubli*, Pharm. Helv. Acta

1937, 1. — *Kuhn & Gerhard*, Hippokrates, 1941, 1284. — *Kühner*, Z. Vitaminf. 1937, **6**, 1. — *Lehnarzt*, Einführung i. d. Physiolog. Chemie, 1937. — *Lund*, Klin. Wschr. 1937, 1085. — *Lund & Lick*, Klin. Wschr. 1937, 555. — *Meyer*, Biochem. Z. 1939, **300**, 297. — *Moll & Küssner*, Mercks Jahresber. 1937. — *Nagayama, Tomoi & Sagara*, Biochem. Z. 1940, **303**, 344. — *Neuweiler*, Klin. Wschr. 1936, I, 856; Z. Vitaminf. 1935, **4**, 39. — *Ott*, Angew. Chem. 1941, **54**, 170; Ref. Pharm. Zh. VIII. 41. — *Pezold*, Z. klin. Med. 1941, **139**, 329. — *Ray*, zit. n. Rytz. — *Reichstein*, Helv. Chim. Acta 1934, **17**, 515. — *Reichstein & Demole*, Uebersicht ü. Chem. u. Biol. Wirkung d. Ascorbinsäuregruppe, Basel 1936. — *Rietschel & Schiek*, Klin. Wschr. 1939, 39. — *Roe & Hall*, J. biol. Chem. 1939, **128**, 329. — *Rosenthaler*, Z. Vitaminf. 1938, **7**, 126. — *Rudolph*, Vitamin C u. Ernährung, Verlag Enke, Stuttgart 1939. — *Ruszugak & Szent-Györgyi*, Nature, London, 1936, II, 227. — *Rytz*, Diss. Bern 1939. — *Savelsberg*, Zahnärztl. Rundsch. 1939, 1919 und 1939, 1950. — *Scheunert & Schieblich*, Handb. d. Lebensmittelchem. 1935, II, 2. Bd. — *Scheunert, Reschke & Kohlemann*, Biochem. Z. 1940, 305. — *Scheunert & Reschke*, Vitamine und Hormone 1941, 195. — *Schopfer*, Arch. f. Mikrobiol. 1936, **7**, 156. — *Seitz*, Vitamine und Hormone, 1939, II. T., Verl. Hirzel, Leipzig. — *Sjamsoedin*, Manndlbl. vor Kindergeneesk 1938, zit. b. Pezold und bei Kuhn. — *Szent-Györgyi und Mitarb.*, Dtsch. med. Wschr. 1936. — *Stutz & Reil*, Veröffentl. Marine-Sanitätswesen, Berlin 1938. — *Stutz & Weisspfennig*, Militärarzt 1939, **4**, 212. — *Tschopp*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 1936, **244**, 59. — *Tothunter, Robbins, Jvey & Brewer*, J. Nutrit. 1940, **19**, 113. — *Tauber, Kleiner & Mishkind*, J. biol. Chem. 1935, **110**, 211. — *Vetter & Winter*, Z. Vitaminf. 1938, **7**. — *Virtanen & van Hausen*, Nature, London 1933, **132**, 408; Nature, London 1934, **133**, 383; Biochem. Z. 1933, **267**, 179; Nature, London 1936, **137**, 779. — *Wachholder & Hamel*, Klin. Wschr. 1937, I. — *Wachholder & Potesta*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 1936, **239**, 149. — *Wachholder, Bauche & Potesta*, Pflügers Arch. 1939, **241**, 495. — *Werder & Antener*, Mitt. d. Lebensmittelunt. u. Hygiene, 1938, 339. — *Weissenböck & Weissenböck*, Protoplasma **34**, 585. — *Widenbauer*, Klin. Wschr. 1937, I. — *Wilhelmi*, Diss. Freiburg i. Br. 1939. — *Wildbolz*, Z. Vitaminf. 1939, **9**. — *Wocker & Antener*, Helv. Chim. Acta 1937, 20. — *Wieters*, Mercks Jahresber. 1935. — *Zilva*, Biochem. J. 1937, 140. — *Zilva*, Nature, 1937, **140**, 588.